Pest Management Regulatory Agency
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire

Regulatory Note

REG2002-02

SPORODEX L End-use Product and *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL Technical Grade Active Ingredient

The technical grade active ingredient *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL and associated end-use biopesticide product SPORODEX L, containing the naturally occurring fungus *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL, for the control of powdery mildew on roses and cucumbers, are proposed for registration under Section 17 of the Pest Control Products Regulations.

This Regulatory Note provides a summary of data reviewed and the rationale for the regulatory decision concerning these biopesticide products.

(publié aussi en français)

June 5, 2002

This document is published by the Submission Coordination and Documentation Division, Pest Management Regulatory Agency. For further information, please contact:

Publications Coordinator
Pest Management Regulatory Agency
Health Canada
2720 Riverside Drive
A.L. 6605C
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Internet: pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Information Service:
1-800-267-6315 or (613) 736-3799
Facsimile: (613) 736-3798

ISBN: 0-662-32234-7
Catalogue number: H113-7/2002-2E

© Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Public Works and Government Services Canada 2002

All rights reserved. No part of this information (publication or product) may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical photocopying, recording or otherwise, or stored in a retrieval system, without prior written permission of the Minister of Public Works and Government Services Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

Foreword

Health Canada's Pest Management Regulatory Agency (PMRA) has issued temporary registrations for technical grade active ingredient, *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL, and its end-use product, SPORODEX L, developed by Plant Products Co. Canada. These products were reviewed jointly as biopesticide products within the North American Free Trade Agreement's Technical Working Group (NAFTA TWG) on Pesticides Joint Review Program by Health Canada's PMRA and the United States (U.S.) Environmental Protection Agency (EPA). Reviews were shared on an informal basis with the Netherlands Pesticide Regulatory Authority.

SPORODEX L is a biological fungicide, containing 1.3% (w/w) *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL, intended for the control of powdery mildew on greenhouse-grown roses and cucumbers. The active microorganism, *Pseudozyma flocculosa*, is a naturally occurring fungus and represents a new biopesticide registration to the U.S. or Canada.

Microbial pest control agents are being investigated increasingly for use as alternatives to conventional pesticides because they are thought to pose a lower potential risk to human health and the environment, compared with conventional pesticides. SPORODEX L represents a potential biopesticide replacement for chemical fungicides.

Plant Products Co. will be providing confirmatory information as a condition of this temporary registration. Following the review of this new data, the PMRA will publish a proposed regulatory decision document and request comments from interested parties before proceeding with a final regulatory decision.

Table of Contents

1.0 The active microorganism, its properties and uses 1
1.1 Identity of the active microorganism and preparation containing it 1
1.2 Physical and chemical properties of technical and end-use product(s) 2
1.3 Details of uses and further information 3

2.0 Methods of analysis 4
2.1 Methods for analysis of the microorganism as manufactured 4
2.1.1 Methods for identification of the microorganism 4
2.1.2 Methods for establishment of purity of seed stock 5
2.1.3 Methods to define the content of the microorganism in the manufactured material used for the production of formulated products 5
2.1.4 Methods for the determination of relevant impurities in the manufactured material 6
2.1.5 Methods to show absence of any human and mammalian pathogens ... 6
2.1.6 Methods to determine storage stability, shelf-life of the microorganism 6
2.2 Methods to determine and quantify residues (viable or non-viable) of the active microorganism and relevant metabolites 6

3.0 Impact on human and animal health 7
3.1 Integrated toxicology summary 7
3.2 Hypersensitivity 8
3.3 Impact on human and animal health arising from exposure to the active substance or to its impurities 9
3.3.1 Occupational and bystander exposure assessment 9

4.0 Residues 10
4.1 Residue Summary 10
4.2 Maximum residue limits 11

5.0 Fate and behaviour in the environment 11

6.0 Effects on non-target species 11
6.1 Integrated environmental toxicology summary 11
7.0 Efficacy 12
7.1 Effectiveness 12
7.1.1 Intended use 12
7.1.2 Mode of action 12
7.1.3 Crops 13
7.1.4 Effectiveness against pest 13
7.1.5 Total spray volume 14

7.2 Phytotoxicity to target plants (including different cultivars) or to target plant products (Organisation for Economic Co-operation and Development 14
7.3 Observations on undesirable or unintended side effects, e.g., on beneficial and other non-target organisms, on succeeding crops, other plants, or parts of treated plants used for propagating purposes (e.g., seed, cutting, runners) .. 14
7.3.1 Impact on succeeding crops 14
7.3.2 Impact on adjacent crops 14
7.3.3 Impact on seed viability 15
7.4 Economics 15
7.5 Sustainability 15
7.5.1 Survey of alternatives 15
7.5.2 Compatibility with current management practices including IPM 17
7.5.3 Contribution to risk reduction 17
7.5.4 Information on the occurrence or possible occurrence of the development of resistance 17
7.6 Conclusions 18
7.6.1 Summary 18

8.0 Toxic Substances Management Policy considerations 19

9.0 Regulatory decision 19

List of abbreviations 21

Appendix I Summary tables 23

1.0 The active microorganism, its properties and uses

1.1 Identity of the active microorganism and preparation containing it

Table 1.1-1 Technical Grade Active Ingredient Identification

Active microorganism	*Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL
Function	Biological fungicide
Binomial name: Taxonomic designation: Kingdom: Phylum: Genus: Species: Strain:	*Pseudozyma flocculosa* (Traquair, J. A., Shaw, L. A., and Jarvis, W. R.) Boekhout, T. and Traquair, J. A., strain PF-A22 UL Fungi Deuteromycotina Dematiaceous Asexual Fungi *Pseudozyma* *flocculosa* PF-A22 UL
Canadian Patent status information	A patent was granted in the name of Her Majesty in right of Canada as represented by the Minister of Agriculture with Plant Products Co. Ltd. as licencee. Canadian Patent Serial No.: 2,011,705 Issued: 1999/06/15 Expires: 2010/03/07 Title: METHOD AND COMPOSITION FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES
Nominal purity of active ingredient	*Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL (TGAI) consists of 100% active ingredient in spent fermentation medium corresponding to a minimum of 3×10^8 colony-forming units (CFU)/mL of *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL. 1.3% w/w (equivalent to a minimum 3×10^8 CFU/mL) in SPORODEX L end-use product.

Identity of relevant impurities of toxicological, environmental, and/or other significance	The technical product does not contain any impurities or microcontaminants known to be Toxic Substances Management Policy (TSMP) Track-1 substances. A stock culture is rejected if biological activity is altered or if mutations are detected. If any contamination is found in the media prior to inoculation, the media is discarded. If contamination exceeds the product release standards for total aerobic flora (<1000 CFU/mL), enterobacteria (<10 CFU/mL), fecal streptococci (absence in 1 g), *Staphylococcus aureus* (absence in 1 g), coliforms (<10 CFU/mL), *Escherichia coli* (absence in 1 g) and *Salmonella* (absence in 1 g), the product is discarded. No mammalian toxins are known to be produced by strain PF-A22 UL.

1.2 Physical and chemical properties of technical and end-use product(s)

Table 1.2-1 Technical Product: *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL

Not applicable. SPORODEX L is manufactured following a continuous manufacturing process that does not involve an intermediate stand-alone technical product.

Table 1.2-2 End-Use Product: SPORODEX L

Property	SPORODEX L
Physical state at 25°C	Liquid
Colour	Beige
Odour	Faint mushroom smell
pH in distilled water	6.4–6.8
Density	1.05 g/mL
Viscosity	51 centipoise
Corrosion character	None

All formulants in Sporodex L are either of food grade quality or are considered relatively non-toxic (i.e., EPA list 3, 4A or 4B). There is no formulant, contaminant, or impurity present in the end-use product that would meet TSMP Track-1 criteria.

1.3 Details of uses and further information

SPORODEX L is an end-use product containing the active ingredient *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL. SPORODEX L is a liquid proposed for use as a biological fungicide to control powdery mildew fungi (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* and *Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse food (Use Site Category #5) and non-food crops (Use Site Category #6), namely cucumbers and roses. SPORODEX L is to be applied in an aqueous solution prepared by diluting 500 mL of product per 100 L of water (equivalent to approximately 10^5 to 10^6 CFU/mL). A wetting agent is added to a final concentration of 0.02% to improve its efficacy. Plants are to be treated beginning when environmental conditions favour development of powdery mildew or at the first sign of the disease. Plants are to be sprayed to the point of runoff at weekly intervals. Up to 1500 L of spray solution is to be applied per hectare for cut roses or cucumbers or about 1000 L/ha for potted plants. After application, the relative humidity is to be maintained above 70% for 12 hours.

Pseudozyma flocculosa was isolated in 1986 from the leaves of red clover, *Trifolium pratense*, infected with powdery mildew, *Erysiphe polygoni*, by researchers at Agriculture and Agri-Food Canada, Harrow, Ontario. Initially, this organism was erroneously identified as a new ascomycetous yeast with an anamorphic state in the broad genus *Sporothrix* and a teleomorphic state in the genus *Stephanoascus*. In 1995, its taxon was changed to *Pseudozyma flocculosa* following ribosomal DNA analysis. The genus *Pseudozyma* contains other smut-like anamorphs, including *P. rugulosa* (formerly *Sporothrix rugulosa). Pseudozyma flocculosa* is a phyllosphere epiphyte and hyperparasite of primarily powdery mildew but has been isolated in association with other leaf-surface moulds. It is widely distributed in North America (Canada and the U.S.A.) and in Europe on aerial plant surfaces in field or greenhouse agricultural ecosystems.

Pseudozyma flocculosa antagonizes a number of different powdery mildew fungi (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, *Sphaerotheca fulginea*, *Erysiphe graminis* var. *tritici* and *Erysiphe polygoni*) on many different plants in greenhouse and field environments when the relative humidity is greater or equal to 70%. This fungus is a necrotroph mycoparasite that kills susceptible target host cells upon contact or in close proximity. Rapid death and collapse of host cells without penetration is brought about by the secretion of three fungitoxic unsaturated C-17 fatty acids (9-heptadecenoic acid, 6-methyl-9-heptadecenoic acid and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid) and an acyclic norterpene (2, 6, 10, 14, 18-pentamethyl-2, 6, 8, 10, 12, 14, 17-nonadecaheptene-1,19-diol). The fungitoxins disrupt susceptible plasma membranes and cytoplasmic organelles within 30 minutes of exposure. The inhibitory response includes a loss of proteins and electrolytes. After 24 hours, the host cells rapidly collapse and die as a result of the activity of the fungitoxins on the host cell's membranes and lipids. Sensitivity to the unsaturated C-17 free fatty acids is related to a high degree of unsaturation of phospholipid fatty acids and a low proportion of sterols.

2.0 Methods of analysis

2.1 Methods for analysis of the microorganism as manufactured

2.1.1 Methods for identification of the microorganism

Appropriate methodologies for detection, isolation, and enumeration of *P. flocculosa* strain PF-A22 UL were detailed by the applicant. The microbial pest control agent (MPCA) is identified using a combination of morphological traits, molecular techniques, and biological activity.

The identification of *Pseudozyma* to the species level is done using a standard mycological approach. *Pseudozyma* species can be differentiated from morphologically similar species such as *Hyalodendron*, *Tilletiopsis*, *Sporobolomyces*, and *Sporothrix*. The branching conidiophores of *Pseudozyma* can be confused with those produced by *Hyalodendron*; however, the whole cell hydrolysates of this filamentous basidiomycete contain xylose, which is not found in *Pseudozyma*. *Tilletiopsis* and *Sporobolomyces*, other saprophytic wild yeasts on aerial plant surfaces, are different from *Pseudozyma* in that they produce spores that are forcibly discharged upon sporulation (ballistospores). Furthermore, *Tilletiopsis* species produce a fungus-degrading β-1,3 glucanase that is not produced by *Pseudozyma* species. The genus *Sporothrix* represents a group of anamorphic ascomycetous yeasts such as *Sporothrix schenckii* (type), an animal pathogen. Physiologically, *Pseudozyma* species differ greatly from *Sporothrix* species. Unlike the ascomycetous *Sporothrix* anamorphs, *P. flocculosa* shows positive reactions in Diazonium Blue B and urease tests typical of all basidiomycetous yeasts. Also, the major ubiquinone is Q-10 rather than Q-8 or Q-9 typical of the ascomycetes, *Saccharomycopsis* and *Stephanoascus*.

Strain PF-A22 UL can be differentiated from other strains of *P. flocculosa* using a DNA-based technique called multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR). The multiplex PCR system is essentially a cocktail of different primers which allows the rapid assessment of numerous DNA fragments in a single PCR amplification. The protocol is based on the amplification of two nuclear regions (ITS and NS), and one mitochondrial region (ML). Those regions were found to be discriminant in the identification of *P. flocculosa* PF-A22 UL.

The integrity and consistency of the MPCA is ensured by two methods. The first method is a DNA-based PCR technique called random amplified microsatellites (RAMS) PCR. Microsatellites are hypervariable non-coding regions of DNA within the genome that evolve more rapidly than coding DNA. The other method is a bioassay that measures biological activity. The biological activity of the MPCA is measured by the inhibition zone created when a susceptible organism is grown next to it. Given that the pest controlled, *Sphaerotheca* species, is an obligate biotroph, it cannot be used directly in this bioassay. Instead, a *Phomopsis* species is used because its sensitivity to *P. flocculosa*'s fungitoxic secretions is similar.

2.1.2 Methods for establishment of purity of seed stock

The mother colony is maintained as slant cultures at 4°C, and as freeze-dried cultures stored at –20°C. The genetic stability of those cultures is verified at least once every six months using RAMS PCR (see Section 2.1.1 for details). The frequency of this analysis is to be increased accordingly if the mother colony begins to show signs of reduced yield.

No method for establishing the purity of the mother colonies was submitted; however, sufficient microbial contaminant screening methods were proposed for the production of *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL and SPORODEX L. There are essentially three types of screening methods involved in the production of *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL and SPORODEX L, namely pre-fermentation sterility tests, MPCA integrity tests, and microbial contaminant screening tests.

Prior to inoculation, all media are screened for the presence of microbial contaminants by plating aliquots of the medium onto plate count agar (PCA) plates. If any microbial contamination is found, the medium is discarded. Similarly, all cultures are monitored for MPCA integrity and microbial contamination by plating various dilutions onto potato dextrose agar (PDA) plates. If significant microbial contamination is detected, the culture is rejected. In case of abnormal colony morphology on PDA, a multiplex PCR analysis (see Section 2.1.1 for details) is performed to properly identify the afflicted colonies. Furthermore, the bioassay method described in Section 2.1.1 is done prior to product formulation to verify its biological control potential. Microbial contaminant screening tests are performed on the formulated end-use product prior to packaging. They are monitored by culturing dilutions of formulated end-use products onto or into various media. The groups of microbial contaminants tested and their proposed product release standards include total aerobic flora (<1000 CFU/mL), enterobacteria (<10 CFU/mL), fecal streptococci (absence in 1 g), *Staphylococcus aureus* (absence in 1 g), coliforms (<10 CFU/mL), *Escherichia coli* (absence in 1 gram) and *Salmonella* (absence in 1 g). If any of the proposed bioburden limits is exceeded, the entire batch is rejected.

2.1.3 Methods to define the content of the microorganism in the manufactured material used for the production of formulated products

The concentration of *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL is determined by measuring the number of viable colony-forming units (CFU) per millilitre of formulated product. For this assay, a 25-mL sample is diluted in peptone, then plated onto PDA. Microscopic observations made on the formulated product ensure that the MPCA is under the proper conidial form. According to product specifications, the guarantee is expressed as greater than 3×10^8 CFU/mL. The biological control potential of the MPCA is measured prior to product formulation using the bioassay method described in Section 2.1.1.

2.1.4 Methods for the determination of relevant impurities in the manufactured material

No known or suspected toxic material is produced by *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL during the fermentation process. Although the majority of the manufacturing process is designed to avoid microbial contamination, some contamination can occur as the end-use product is centrifuged and formulated under non-sterile conditions. As mentioned in Section 2.1.2, there are various methods to monitor the levels of various groups of contaminating microorganisms in the formulated product.

Quality control data from five batches (1 commercial-scale and 4 pilot-scale batches) of SPORODEX L were assessed using the microbial contaminant screening methods described in Section 2.1.1. The total aerobic flora in SPORODEX L ranged from 150 to 2×10^4 CFU/mL. Both the enterobacteria and fecal coliform counts were 0 CFU/mL and no enterococci, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, or *Salmonella* were detected in SPORODEX L. It must be noted that two of the five batches, including the only commercial batch, were destroyed due to microbial contamination. In one of those batches, the total aerobic flora exceeded the product release standard for this group of contaminants, i.e., $< 10^3$ CFU/mL. In the other, significant microbial contamination was detected during an MPCA integrity test on PDA. Both of those batches were rejected.

Given that two batches were destroyed as a result of microbial contamination, the submission of certificates of analysis for all production batches of SPORODEX L will be required as a condition of registration by the PMRA and the U.S. EPA.

2.1.5 Methods to show absence of any human and mammalian pathogens

As discussed in Section 2.1.2, the quality assurance program implemented by the applicant for the production of SPORODEX L requires the destruction of the batch if any of those product release standards (including animal and human pathogens) is exceeded in the formulated product.

2.1.6 Methods to determine storage stability, shelf-life of the microorganism

Storage stability data are required to ensure product performance and safety. The data included in the submission package were derived from a single batch of SPORODEX L over a period of 11 months at -20°C. Additional storage stability data derived from at least five production-scale or pilot-scale batches are required to support label claims and ensure product performance and safety. An expiration date of three months from the date of manufacture is required until additional data are generated.

2.2 Methods to determine and quantify residues (viable or non-viable) of the active microorganism and relevant metabolites

Although *Pseudozyma* species are ubiquitous in nature and have been isolated from a wide variety of plant surfaces including leaf litter, clover, maize, and cucumber, no

adverse effect has been attributed to natural populations of *P. flocculosa*. Given that no significant adverse effect is reported in the acute oral toxicity/pathogenicity study and that no report in literature suggests that *Pseudozyma* (*Sporothrix*) *flocculosa* produces mammalian toxins, the establishment of a maximum residue limit (MRL) is not required for *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL. Consequently, no method to quantify *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL residues in food and feed is required.

Analytical methods for detecting viable *Pseudozyma flocculosa* residues in animal and human body tissues involve blending of tissues and recovery on yeast malt agar (YM) or Martin's agar (MA). If needed, a multiplex PCR analysis (see Section 2.1.1 for details) can be performed to discriminate strain PF-A22 UL from other strains of *P. flocculosa*.

3.0 Impact on human and animal health

See Appendix I, Table I, for summary table.

3.1 Integrated toxicology summary

The registration package submitted by Plant Products Co. in support of registering the TGAI *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL and SPORODEX L, was reviewed from the viewpoint of human health and safety and was determined to be sufficiently complete to permit a decision on registration. The information provided to address the characterization of the active ingredient as well as the manufacturing process and quality control adequately addressed the potential human health and safety concerns associated with *P. flocculosa* strain PF-A22 UL and bacterial/fungal contaminants introduced during production.

No sign of toxicity or pathogenicity was noted when SPORODEX WP, a wettable powder formulation, was administered to rats via the oral route.

Intratracheal administration of *P. flocculosa* resulted in a significant number of spontaneous deaths among both test substance (TS)- and heat-killed test substance (KTS)-dosed animals. Presence of the test organism in the stomach and small intestines indicated a possible dosing error. In a second pulmonary study, there were no mortalities but rough hair coat occurred in a dose-dependent manner. Based on this study, *P. flocculosa* was classified as slightly toxic. This study was considered supplemental because infectivity was not assessed and because the test substance was not the recommended TGAI. The label must be upgraded with a statement requiring respirators for all users and a full acute pulmonary toxicity/infectivity replacement study, using the TGAI and the sterile filtrate of the production culture, will be required.

Pseudozyma flocculosa was found to be slightly toxic but non-pathogenic when administered to rats via intraperitoneal injection. There were no mortalities or adverse clinical symptoms. White nodules and higher relative spleen weights were noted at necropsy and attributed to a normal immune response to a foreign substance. Male

TS-dosed rats, however, exhibited decreased body weight gain despite increased food consumption, indicating that *P. flocculosa* was slightly toxic. Clearance of the test organism occurred within 7 days, indicating lack of pathogenicity.

Pseudozyma flocculosa was not toxic or irritating when applied dermally to rabbits. A waiver rationale was submitted to address the toxicity and/or irritation potential of the formulation ingredients in SPORODEX L. All formulation ingredients are either food-grade or relatively non-toxic. One formulation ingredient may cause irritation of the skin with prolonged contact. Standard personal protective equipment requirements are adequate.

Slight conjunctival redness was observed after administration of SPORODEX WP to the eyes of rabbits. The irritation potential of SPORODEX L is expected to be less than that of SPORODEX WP. Standard label statements, instructing users to avoid contact with eyes, are sufficient.

Pseudozyma flocculosa has not been reported to produce any mammalian toxin. The applicant included computer literature search results to a number of keywords such as pseudozyma*, tilletiopsis, fate, non target, carcin*, mutagen*, toxic*, pathogen*, antibiotic*, polyen*, sporothrix, sporobolomyces, rhodotorula, phyllosphere yeast*, carcinog*, and teratogen*. The literature search covered *AGRICOLA*, Biological Abstracts, CAB Abstracts, CHEMTOX, RTEX, and AGRIS databases from 1980 to 1999. No reports of mammalian toxicity were found in standard biological, chemical, and toxicological abstracts.

Survival, replication, infectivity, significant toxicity, or persistence of the MPCA was not observed in the test animals treated in Tier I acute oral, pulmonary, and intravenous toxicity/infectivity tests. Consequently, higher tier tests involving subchronic and chronic testing, oncogenicity testing, mutagenicity, and teratogenicity were not required, based on the lack of concerns following analysis of Tier I test results.

The active ingredient, *P. flocculosa* strain PF-A22 UL, is not known to be a human pathogen nor an endocrine disrupter. The submitted toxicity/pathogenicity studies in the rodent indicate that, following several routes of exposure, the immune system is still intact and able to process and clear the active ingredient. Therefore, no adverse effect to the endocrine or immune systems is known or expected.

3.2 Hypersensitivity

A skin sensitization study was not submitted on the microbial active ingredient, *P. flocculosa*, as hypersensitivity studies are not required by the PMRA to support the registration of microbial pest control agents. Skin sensitizing studies are not considered substitutes for timely reports of hypersensitivity incidents subsequent to registration approval.

No adverse effect has been noted among researchers who have worked closely with *P. flocculosa* strain PF-A22 UL for up to 10 years. The applicant has submitted a waiver rationale from conducting a dermal sensitization study based on the assumption that most microorganisms contain substances that could elicit a hypersensitivity response. *Pseudozyma flocculosa* is considered a potential sensitizing agent; therefore, the statement "POTENTIAL SENSITIZER" is required on the principal display panels of the technical and end-use formulation labels. The use of personal protective equipment will also be required to mitigate against potential dermal sensitization in occupationally exposed workers/handlers. As a condition of registration, the applicant will be expected to report any subsequent findings of hypersensitivity or other health incidents to workers, applicators, or bystanders exposed to the MPCA. Incident reports are to include details such as a description of the MPCA and formulation, frequency, duration and routes of exposure to the material, clinical observations, and any other relevant information.

3.3 Impact on human and animal health arising from exposure to the active substance or to its impurities

3.3.1 Occupational and bystander exposure assessment

Occupational exposure is of particular concern as the product will be used in an enclosed environment. The PMRA, however, does not expect that occupational exposure will pose an undue risk on the basis of the low toxicity/pathogenicity profile for *P. flocculosa* provided that precautionary label statements are followed. When handled according to the label instructions, the pulmonary, dermal, and ocular routes are potential routes of applicator and bystander exposure.

Dermal exposure via the skin would be the primary route of exposure for applicators. Since unbroken skin is a natural barrier to microbial invasion of the human body, dermal absorption could occur only if the skin were cut, if the microbe were a pathogen equipped with mechanisms for entry through or infection of the skin, or if metabolites were produced that could be dermally absorbed. *Pseudozyma flocculosa* is not known to be a human pathogen nor is it known to produce metabolites that are dermally absorbed. Based on the minimal adverse effects in the intraperitoneal study, it is the PMRA's opinion that even cut skin should not pose a significant risk to health via entry of absorbed *P. flocculosa* into the body. Although the MPCA has been found to be non-toxic and non-irritating following dermal exposure, it is a potential sensitizer. Label restrictions and risk mitigation measures are required to protect populations who are likely to be primarily exposed to the pesticide. Such exposure to pesticide handlers can be reduced if they wear long-sleeved shirts, long pants, shoes, and socks.

Inhalation would be another route of exposure for mixer/loader applicators and possibly early-entry workers. Based on the results of the pulmonary study in which lesions were noted on the lungs of some treated animals, pesticide handlers must wear a dust/mist-filtering respirator with National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) prefix –95, R-95, P-95 or HE filter for biological products. A restricted entry interval of

four hours will also be required for early-entry workers or other persons entering treated greenhouses.

SPORODEX WP was found to be minimally irritating to the rabbit eye and, based on the nature of its formulation ingredients, SPORODEX L is expected to be less irritating. Eye protection will not be required.

The label does not allow applications to turf, residential, or recreational areas. Because the use sites are in greenhouses, exposure to infants and children in school, residential, and daycare facilities is likely to be minimal to non-existent. Consequently, the health risk to infants and children is expected to be negligible to non-existent.

4.0 Residues

4.1 Residue Summary

According to its proposed use pattern, SPORODEX L will be applied by foliar spray to rose and cucumber plants. The proposed food use pattern is likely to result in residues on food and feed. However, residues of the microbial pesticide are likely to be removed from treated food by washing, peeling, cooking and processing. Even if residues are not removed, dietary exposure to the microbial agent is unlikely to result in any undue hazard to consumers because no adverse effect was observed at maximum hazard dose levels in the submitted Tier I acute oral study. Furthermore, an extensive literature search yielded no report of mammalian toxins being produced by *P. flocculosa* (see Section 3.1). The fungitoxic unsaturated C-17 fatty acids and acyclic norterpene produced by the MPCA have not been reported to be toxic to mammals. Neither this organism nor its close relatives are listed among microbial contaminants of food.

Subchronic and chronic dietary exposure studies are not required since the Tier I acute oral study demonstrated a low level of toxicity and no pathogenicity potential for the active microorganism. Because of the low toxicity profile and low exposure potential of the MPCA, there is no concern for chronic risks posed by dietary exposure of sensitive subpopulations, such as infants and children.

Although heavy rainfall likely carries *P. flocculosa* into neighbouring aquatic environments, growth and survival of terrestrial fungi such as *P. flocculosa* are limited in such environments. Thus, it is not expected to proliferate in aquatic habitats following incidents of direct or indirect exposure (e.g., runoff from treated greenhouses). Moreover, *P. flocculosa* is not considered to be a risk to drinking water. Accordingly, drinking water is not specifically screened for *P. flocculosa* as a potential indicator of microbial contamination or as a direct pathogenic contaminant. Both percolation through soil and municipal treatment of drinking water would reduce the possibility of significant transfer of residues to drinking water. Therefore, the potential of exposure and risk via drinking water is likely to be minimal to non-existent for this MPCA.

4.2 Maximum residue limits

Although *Pseudozyma* species are ubiquitous in nature and have been isolated from a wide variety of plant surfaces including leaf litter, clover, maize and cucumber, no adverse effect from dietary exposure has been attributed to natural populations of *P. flocculosa*. Furthermore, no adverse effect was observed in the acute oral toxicity/pathogenicity study and there is no report of known mammalian toxins being produced by the MPCA. Therefore, the establishment of an MRL is not required for *P. flocculosa* strain PF-A22 UL under Section 4(d) of the *Food and Drugs Act* (adulteration of food) as defined under Division 15, Section B.15.002 of the Food and Drugs Regulations.

5.0 Fate and behaviour in the environment

Environmental fate data (Tier II) were not triggered as adverse effects on non-target organisms are not expected from the proposed greenhouse use of *P. flocculosa* strain PF-A22 UL.

6.0 Effects on non-target species

See Appendix I, Table II, for summary table.

6.1 Integrated environmental toxicology summary

Acceptable waivers were submitted to address environmental toxicology requirements. Non-target organisms, including birds, wild mammals, freshwater fish, aquatic and terrestrial arthropods, non-arthropod invertebrates, and aquatic and terrestrial plants are not expected to face increased exposure to *P. flocculosa* due to use of SPORODEX L in commercial greenhouses. No adverse effect on these non-target organisms has been reported in the literature. Studies to assess the effect of *P. flocculosa* on these organisms are not required.

Pseudozyma flocculosa is a saprophytic fungal epiphyte and a hyperparasite of powdery mildew. Collapse of susceptible host cells and rapid death occur via the secretion of three fungitoxic unsaturated C-17 fatty acids and an acyclic norterpene. The fungitoxins disrupt susceptible plasma membranes and cytoplasmic organelles while the acyclic norterpene has limited antifungal potential. Despite the mode of action associated with *P. flocculosa*, its host range is limited to mainly powdery mildews (e.g., *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, *S. fulginea*, *Erysiphe graminis* var. *tritici* and *E. polygoni*). Although *in vitro* bioassays have shown that soil-borne fungi such as *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, and *Rhizoctonia* species and selected Gram-negative (e.g., *Xanthomonas campestris*) and Gram-positive (e.g., *Bacillus subtilis*) bacteria were weakly to moderately susceptible to *P. flocculosa*, *P. flocculosa* being a phyllosphere epiphyte and a non-rhizosphere competent organism is not expected to have significant effect on soil-

borne microorganisms. Based on the limited host range of *P. flocculosa*, no non-target microorganism testing will be required.

The formulants in the end-products, SPORODEX L, do not pose an environmental risk when used at the proposed concentrations and application rate for control of powdery mildew on roses and cucumbers grown in greenhouses. Consequently, SPORODEX L is expected to pose little environmental risk when used in accordance with the label directions. Furthermore, no special precautionary or environmental hazard statement is required on the label for SPORODEX L.

7.0 Efficacy

7.1 Effectiveness

7.1.1 Intended use

For control of powdery mildew in greenhouse crops.
Mix 500 mL of SPORODEX L for each 100 L water. Add a wetting agent at 0.02%.

Apply up to 1500 L of water per ha for cut roses or cucumbers and 1000 L per ha for potted plants. Spray foliage of plants to runoff at weekly intervals, beginning when environmental conditions favour development of powdery mildew or at first sign of the disease.
Maintain RH above 70% for 12 hours after application.

Use of chemical fungicides at the same time as SPORODEX may inhibit this product's activity against powdery mildew.

Keep frozen at -20 °C or lower in the freezer until use; thaw at room temperature prior to using.

7.1.2 Mode of action

SPORODEX L is a liquid formulation containing *Pseudozyma flocculosa* (synonym *Sporothrix flocculosa*) at 3×10^8 cfu/mL. The strain of *P. flocculosa* that is the basis of this product was isolated from powdery mildew on weeds near Harrow, Ontario, in 1988. It has been found to be antagonistic to most species of powdery mildew pathogens, and appears to be common in horticultural and agricultural environments where powdery mildews are found. Host range may include antagonism to *Sphaerotheca* and *Erysiphe* but it is less active on *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, and *Rhizoctonia* according to *in vitro* bioassays. *Pseudozyma* destroys the integrity of host cell membranes through the action of fatty acid metabolism, causing cell leakage, but does not appear to colonize host hyphae. Optimal conditions for infection of host fungi are 26° C and > 70% RH. *Pseudozyma* will colonize leaves in the absence of powdery mildew but undergoes rapid reproduction only when the disease is present.

7.1.3 Crops

SPORODEX L is intended for use on greenhouse roses and cucumbers.

7.1.4 Effectiveness against pest

Eleven trials with *Pseudozyma flocculosa* on cucumbers were conducted in the Netherlands and Canada in research or commercial greenhouses. Plants were grown in rockwool according to normal hydroponic production practices. SPORODEX WP (two early formulations) or SPORODEX L were applied at intervals as per label directions to plants which were usually inoculated with powdery mildew (*Sphaerotheca* spp.) For comparison, commercial fungicide standards were applied as needed. Powdery mildew (percent diseased leaf area on whole plants) was assessed at intervals and an area under disease progress curve for the whole season was generated for comparison of treatments. Cucumbers were harvested and graded, and total yield or first class grade yield were recorded.

In seven cucumber trials, based on total disease over the season, SPORODEX WP provided 18–48% control which was significantly different from the check but less than that provided by the chemical fungicides (44–66%). In two comparative trials under moderate disease pressure, a newer formulation of SPORODEX WP showed significantly better control (>56%) than the check and than the older formulation which was not effective. Yield of SPORODEX-treated cucumbers was generally greater than the check and slightly lower than chemically treated plants.

Rose powdery mildew studies were conducted in Canadian and Columbian greenhouses. SPORODEX WP was comparable in efficacy to various chemical fungicides and often resulted in better quality or yield of roses. The product was less effective where high humidity was not maintained.

One confirmatory trial with the proposed SPORODEX Liquid formulation showed that it is as effective as myclobutanil against powdery mildew on cucumber. In this trial, an application of pine oil (fertilizer) in midseason adversely affected SPORODEX which resulted in lack of disease control on lower leaves and showed that pine oil is not compatible with SPORODEX. Results are available from two additional trials in the Netherlands and British Columbia (B.C.); these showed that reduction of powdery mildew and improved rose yield with SPORODEX L were comparable to results with dodemorph-acetate. Efficacy studies showed a need to maintain high humidity (>70% RH) for continued viability and effectiveness of SPORODEX products.

These studies show that SPORODEX can provide comparable efficacy to chemical fungicide sprays in controlling powdery mildew and improving yield of cucumbers and quality of greenhouse roses. SPORODEX significantly reduced powdery mildew compared with untreated checks. Although the early formulation was not as effective as chemical standards, limited trials with more recent formulations suggest that

SPORODEX L will be as effective as chemical standards provided that high humidity is maintained. Further, it does not cause phytotoxic effects which indirectly lowered yields as seen with some chemical treatments.

The proposed rate of SPORODEX L was 500 mL product in 100 L water, applied to runoff (1500 L/ha for cut roses and cucumbers and 1000 L/ha for potted roses). This delivers approximately 1×10^9 cfu/L of *P. flocculosa,* which was the concentration used in most of the efficacy trials with various formulations. A lower rate may also be effective but should not be considered until crop management practices have developed to give more consistent disease control performance at the current rate.

7.1.5 Total spray volume

SPORODEX L is intended to be applied in up to 1500 L water per ha for cut roses and cucumbers and 1000 L for potted plants.

7.2 Phytotoxicity to target plants (including different cultivars) or to target plant products (Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD] 7.4)

No adverse effect of SPORODEX formulations was noted in greenhouse trials with cucumber or rose. The additive paraffin oil (1%) used with SPORODEX was noted to cause a slight edema (water blisters) on the underside of rose leaves of one cultivar and the use of oil was discontinued in that trial. The oil was typically used at lower concentrations in other trials and is not recommended on the SPORODEX L label.

7.3 Observations on undesirable or unintended side effects, e.g., on beneficial and other non-target organisms, on succeeding crops, other plants, or parts of treated plants used for propagating purposes (e.g., seed, cutting, runners) (OECD 7.5)

SPORODEX L was tested in commercial greenhouses throughout its development, using typical production practices including integrated pest management (IPM) and biological control organisms. In these efficacy trials, observations suggested that the product has no adverse effect on crop plants, or on beneficial insects or mites with respect to pest control. However, direct assays to confirm no adverse effect of SPORODEX L on specific biocontrol insects and arthropods were not conducted.

7.3.1 Impact on succeeding crops (OECD 7.5.1)

Not applicable to greenhouse use.

7.3.2 Impact on adjacent crops (OECD 7.5.2)

Not applicable to greenhouse use; adjacent crops (if any) are typically grown within separate compartments.

7.3.3 Impact on seed viability (OECD 7.5.3)

Not applicable to proposed crops.

7.4 Economics

According to the applicant, the farm gate value of greenhouse cucumbers in Ontario is $25 million. There are also greenhouse areas in BC, Alberta and Quebec. Crops are worth $625,000–$1,250,000 per ha annually. There are about 24 ha of greenhouse roses in Canada, mostly in Ontario, with some operations in B.C., Alberta, and Quebec. Grade #1 roses are priced at $0.50 per stem.

Although it rarely affects fruit, powdery mildew spreads rapidly on leaves and can cause a loss of photosynthetic area, and water stress, leading to reduced flower production or yield and up to 100% loss. Mildew can also affect marketability and the price of roses as there is zero tolerance for the presence of white mildew spots on the leaves and blooms; they will be downgraded. The price difference to growers for grade #1 to grade #2 roses is $0.15 per stem, and control of mildew could potentially increase revenues by $37,000 per ha. Fungicides are currently used to control mildew but can have adverse effects on yield, and on fruit and flower quality.

7.5 Sustainability

7.5.1 Survey of alternatives

Powdery mildew is currently managed by environmental control, tolerant cultivars, sanitation and chemical fungicides. The trend in greenhouse production is to reduce chemical pesticide use as much as possible. Thus, there is a need for alternative products to use in the disease management program.

7.5.1.1 Non-chemical control practices

Powdery mildew is partly managed by environment control; however, this is difficult to balance because the different stages of disease development are favoured by different conditions. For example, both low humidity and free water on leaves followed by rapid drying have been found to reduce disease, yet daily fluctuations in humidity can increase disease. In general, growers should avoid conditions which lead to succulent foliage, i.e., shading, overcrowding, overwatering, or overfertilizing. The fungal spores will not survive long outside host plant material, so a thorough cleanup and break period of 2–3 weeks between crops can reduce carryover of inoculum. Seedlings which are already started should be cultivated in isolation from the older producing plants. Teardown and replant of the cucumber crop is a labour intensive operation due to the volume of vine material handled, so the plants are usually maintained as long as is profitable.

Mildew-resistant cucumber and rose cultivars are not available in practice for Canadian conditions; although some tolerance is available, these cultivars may not be commercially desirable. For instance, in B.C. cucumber production, more resistant varieties are grown in fall when mildew pressure is high but they are lower-yielding and more prone to Botrytis and gummy stem than mildew-susceptible varieties grown earlier in the year. Choice of rose varieties is dependent on market acceptability for colour and other characteristics rather than tolerance to powdery mildew.

7.5.1.2 Chemical control practices

Few chemical products are available for powdery mildew control in greenhouses. Myclobutanil and sulfur are registered in Canada for cucumbers, and dodemorph-acetate and copper are registered for roses. The most effective products are systemic, must be applied frequently, may be toxic to beneficial insects, and are prone to development of resistance in the powdery mildew pathogens. Both myclobutanil and dodemorph were noted to cause phytotoxicity to flowers and fruit under some conditions, and reduced leaf size has been reported for both cucumber and rose. Silicon has been investigated as a disease preventive, either applied into hydroponic solution or as a foliage spray, but has not been consistently effective on its own. Milsana is another non-fungicidal product under investigation but not used commercially in Canada. The trend in greenhouse production is to reduce chemical pesticide use as much as possible. Thus, there is a need for alternative products to use in the disease management program.

Table 7.5-1 Alternative disease control products

Active Ingredient	End-Use Products	Fungicide Activity Site	Application Rate (product/1000 L)		Comments
			Cucumber	Rose	
Myclobutanil	Nova 40W	demethylation	340 g/ha		Can affect leaf and fruit growth, prone to resistance
Sulfur	Kumulus, MicroNiasul	multisite	1.2–1.5 kg		Harmful to some beneficial mites, can be phytotoxic
Copper	Phyton 27	multisite		1.25–2.5 L	
Dodemorph-acetate	Meltatox 40EC	isomerase		2.5 L	Can reduce bloom quality

7.5.2 Compatibility with current management practices including IPM

SPORODEX L has potential to reduce or replace chemical fungicide sprays on cucumbers and roses and efficacy trials showed that it can be alternated with some of those products. SPORODEX L also appears to be compatible with IPM practices for control of insects and mites (see Section 7.3). However, SPORODEX L has not been tested for compatibility with all chemical products or with other microbial disease control organisms; therefore, the grower should be referred to the manufacturer for updated information.

IPM practices currently include the monitoring of crops for signs of early disease, which is necessary to ensure that SPORODEX L is applied at the earliest opportunity for maximum effectiveness. At present, the value of SPORODEX L is limited by its susceptibility to changing environmental conditions. Growers and extension staff will need to invest further work in determining the best local production practices for viability and efficacy of SPORODEX L in the greenhouse to obtain optimum powdery mildew control and thereby reduce the need for chemical products.

7.5.3 Contribution to risk reduction

It is expected that SPORODEX L will be used in greenhouses to control powdery mildew in situations of lower disease pressure and at the beginning of the growing season to delay the progress of the disease. In this way it may alleviate or defer the need for chemical fungicide applications thus reducing the associated risks of pesticide resistance, effects to workers and on the environment.

7.5.4 Information on the occurrence or possible occurrence of the development of resistance

Powdery mildew pathogens have been known to develop resistance to chemical fungicides; however, resistance to *Pseudozyma flocculosa* is less likely because of its broad mode of action and lack of persistence on the crop plant. *Pseudozyma flocculosa* destroys the integrity of host cell membranes, causing cell leakage. Optimum conditions for colonization do not occur continuously in the greenhouse environment. It will colonize leaves in the absence of powdery mildew but undergoes rapid reproduction only when the disease is present.

SPORODEX L does have a role in prolonging effectiveness of chemical fungicides. By reducing pathogen populations and the number of fungicide sprays applied for control of powdery mildew, SPORODEX L may reduce pressure on the pathogen to develop resistance to site-specific fungicides.

7.6 Conclusions

7.6.1 Summary

SPORODEX L is a liquid formulation containing *Pseudozyma flocculosa* at 3×10^8 cfu/mL for control of powdery mildew in greenhouse roses and cucumbers. The proposed rate of SPORODEX L is 500 mL product in 100 L water, applied to runoff (1500 L/ha for cut roses and cucumbers and 1000 L/ha for potted roses). Eleven trials with *Pseudozyma flocculosa* on cucumber were conducted in the Netherlands and Canada in research or commercial greenhouses. Five rose powdery mildew studies were conducted in Canadian and Colombian greenhouses. SPORODEX L significantly reduced powdery mildew compared with untreated checks. Although the early formulation was not as effective as chemical standards, limited trials with more recent formulations suggest that SPORODEX L will be as effective as chemical standards provided that high humidity is maintained. Further, it does not cause phytotoxic effects which indirectly lowered yields, as seen with some chemical treatments. Further work is needed on managing the greenhouse environment for full disease control benefits of SPORODEX L to be realized.

SPORODEX L is a microbial product which may be affected by co-application of fungicides and other products. The label precautions should be expanded to advise the grower of this and include guidance for better performance. SPORODEX L has not been shown to adversely affect other tools such as biocontrol agents, shows no phytotoxic effects on the crop and is generally compatible with IPM practices which are being adopted for greenhouse production.

Table 7.6-1 Summary of label proposals and recommendations

Proposed		Recommendation (based on Value Assessment)
Greenhouse crops	Cucumber Roses (potted or cut)	as proposed
Rate	500 mL /100L of water with 20 mL wetting agent Use up to 1500 L spray per ha for cut roses, cucumbers, up to 1000 L for potted roses	as proposed
Application method	Diluted spray applied to foliage to runoff	as proposed

	Proposed	Recommendation (based on Value Assessment)
Timing of applications	Weekly from first disease or when environmental conditions favour development of disease	as proposed
Conditions	Maintain RH >70% for 12 hours Do not apply at same time as chemical fungicides	provide additional details/guidance

8.0 Toxic Substances Management Policy considerations

Pseudozyma flocculosa strain PF-A22 UL in SPORODEX L does not meet TSMP Track-1 criteria because the active ingredient is a biological organism and hence is not subject to the criteria used to define persistence, bioaccumulation, and toxicity properties of chemical control products. There is also no formulant, contaminant, or impurity present in the end-use product that would meet the TSMP Track-1 criteria.

9.0 Regulatory decision

The active ingredient *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL, and the formulated product SPORODEX L for control of powdery mildew on greenhouse-grown roses and cucumbers have been granted temporary registration pursuant to Section 17 of the Pest Control Products Regulations, on the condition that the applicant carry out the following:

- submits certificates of analysis for all production batches;
- reports all incidents of hypersensitivity occurring following registration;
- provides storage stability data for at least five pilot-scale or production-scale batches;
- provides a full acute pulmonary toxicity / pathogenicity replacement study.

List of abbreviations

bw	body weight
CFU	colony-forming units
DNA	deoxyribonucleic acid
dw	dry weight
EPA	Environmental Protection Agency (U.S.)
IPM	integrated pest management
KTS	killed test substance
LD_{50}	lethal dose 50%
MAS	maximum average score
MIS	maximum irritation score
MPCA	microbial pest control agent
MRL	maximum residue limit
NC	naive control
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PMRA	Pest Management Regulatory Agency (Health Canada)
RAMS	random amplified microsatellites
RH	relative humidity
TGAI	technical grade of the active ingredient
TS	test substance
TSMP	Toxic Substances Management Policy
U.S. or U.S.A.	United States of America

Appendix I Summary tables

Table I Summary of toxicity and pathogenicity studies with *Pseudozyma flocculosa*

STUDY	[illegible]	[illegible]	[illegible]
ACUTE [illegible]			
Oral	Rat — Fisher 344, 12/sex, ♂ 5.8×10^9 CFU[1]/animal ♀ 5.6×10^9 CFU/animal SPORODEX WP	♂ $LD_{50} > 5.8 \times 10^9$ CFU/animal ♀ $LD_{50} > 5.6 \times 10^9$ CFU/animal	No effect on body weight gain or feed consumption and no clinical signs of treatment-related toxicity, infectivity, or pathogenicity. No mortalities. Agent cleared from the gastrointestinal tract within seven days of dosing and was not detected in the urine, blood, or organs at any time. No significant findings observed at necropsy. **LOW TOXICITY AND NO PATHOGENICITY.**
Pulmonary	Rat — CD, 12/sex, 3.2×10^7 CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	$LD_{50} > 3.2 \times 10^7$ CFU/animal	Laboured breathing, rough hair coat, ocular discharge and nasal discharge observed in TS[2]- and KTS[3]-dosed animals. Hunched posture and lethargy observed in one TS-dosed female and one TS-dosed male, respectively. Mortalities included 3 ♂ TS-dosed, 6 ♂ KTS-dosed, 2 ♀ TS-dosed and 4 ♀ KTS-dosed rats. No effect on body weight based on rats sacrificed on day 14. Daily food consumption analysis and relative organ weights either not determined or did not include animals that died prior to their scheduled sacrifice dates. Necropsy findings including lesions and enlargement of the lung, confluent dark areas in the kidneys, lesions and enlargement of the spleen and lung lesions in ♂ and ♀ rats dosed with TS and KTS were attributed to the method of dosing and the body's normal immunological response to a foreign substance. Agent was detected in the lungs and lymph nodes, stomach and small intestines. Clearance from these organs by day 7. Study classified as **UNACCEPTABLE.**
Pulmonary — Range Finding	Rat — CD, 5/sex/dose level 4.2×10^7 CFU/animal 3.4×10^7 CFU/animal 6.8×10^6 CFU/animal 3.4×10^6 CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	$LD_{50} > 4.2 \times 10^7$ CFU/animal	No mortalities. All animals gained weight over the course of the 14-day study. Rough hair coat occurred in a dose-dependent manner. One female rat dosed at 4.2×10^7 CFU presented with tremors, closed eyes, and rough hair coat. **SLIGHTLY TOXIC; PATHOGENICITY NOT DETERMINED.** Study classified as **SUPPLEMENTAL.** Upgraded label statements required.

Intraperitoneal Injection	Rat — Sprague Dawley, 12/sex, 3.5×10^7 CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	$LD_{50} > 3.5 \times 10^7$ CFU/animal	No effect on body weight but body weight gain significantly lower in TS-dosed ♂ rats despite increased food consumption by TS-dosed ♂ rats. No clinical symptoms or mortalities. White nodules noted on stomach, caecum, liver or small intestine of ♂ and ♀ rats dosed with TS and KTS attributed to normal immunological response to a foreign substance. Increased relative spleen weight in ♀ TS- and KTS-dosed rats also considered to be a normal response. Following injection, the test microbe was recovered from the caecum, kidneys, liver, lungs and associated lymph nodes, spleen, stomach, and small intestines of ♂ and ♀ TS-dosed rats. Clearance of the test organism occurred within 7 days of administration. **SLIGHTLY TOXIC AND NO PATHOGENICITY**
Dermal Toxicity and Irritation	Rabbit — New Zealand White, 5/sex 1.2×10^7 CFU/animal *Pseudozyma flocculosa* (equivalent to approximately 0.82–0.90 g/kg bw for ♂ and 0.80–0.91 g/kg bw for ♀)	$LD_{50} > 1.2 \times 10^7$ CFU/animal (♂ $LD_{50} > 0.82$–0.90 g/kg bw ♀ $LD_{50} > 0.80$–0.91 g/kg bw)	No mortalities. One ♂ rabbit lost weight within the first week but experienced a slight weight gain thereafter. All other animals gained weight. Slight diarrhea observed in one ♂ 7 days after administration. No other adverse clinical symptoms. No signs of dermal irritation. **LOW TOXICITY AND NON-IRRITATING.**
Eye Irritation	Rabbit — New Zealand White, 6 females, 0.1 g (equivalent to 5.7×10^7 CFU/animal) SPORODEX WP	MIS[4] = 1.7 / 110 at the one-hour scoring interval MAS[5] = 0.22	Slight conjunctival redness observed in 5/6 animals at the one-hour scoring interval. By the 24-hour scoring interval, only 2/6 animals continued to exhibit slight conjunctival redness. All signs of ocular irritation were absent at the 48-hour scoring interval. No other signs of ocular irritation or adverse clinical symptoms. No mortalities. SPORODEX WP formulation expected to be more irritating to the eye than SPORODEX L. **MINIMALLY IRRITATING.**

[1] CFU = Colony Forming Units
[2] TS = Test Substance
[3] KTS = Killed Test Substance
[4] MIS = Maximum Irritation Score
[5] MAS = Maximum Average Score (based on scores from 24-, 48- and 72-hour scoring intervals)

Table II Risk of *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL to non-target organisms

Birds	Oral/ Pulmonary / Inhalation / Injection	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Wild mammals	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Freshwater fish	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Arthropods	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Non-arthropod invertebrates	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Microorganisms	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	Although non-target microorganisms may be at potential risk, the waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on limited host range.
Plants	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the company was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Pest Management Regulatory Agency

Note réglementaire

REG2002-02

Préparation commerciale SPORODEX L et matière active de qualité technique (MAQT) *Pseudozyma flocculosa* souche PF-A22 UL

La matière active de qualité technique *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL) et sa préparation commerciale biopesticide SPORODEX L, contenant le champignon d'origine naturelle *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL), utilisé pour lutter contre le blanc sur les roses et les concombres, sont soumises pour homologation en vertu de l'article 17 du *Règlement sur les produits antiparasitaires*.

La présente note réglementaire fournit un sommaire des données examinées et les raisons à l'origine de la décision réglementaire relative à ces produits biopesticides.

(also available in English)

Le 5 juin 2002

Ce document est publié par la Division de la documentation et de la coordination des demandes d'homologation, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec la :

Coordonnatrice des publications
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Santé Canada
I.A. 6605C
2720, promenade Riverside
Ottawa (Ontario)
K1A 0K9

Internet : pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Service de renseignements :
1-800-267-6315 ou (613) 736-3799
Télécopieur : (613) 736-3798

ISBN: 0-662-87234-7
Numéro de catalogue: H113-7/2002-2F

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada, représenté par le Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada 2002

Tous droits réservés. Il est interdit de reproduire ou de transmettre l'information (ou le contenu de la publication ou produit), sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, enregistrement sur support magnétique, reproduction électronique, mécanique, ou par photocopie, ou autre, ou de l'emmagasiner dans un système de recouvrement, sans l'autorisation écrite préalable du Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

Avant-propos

L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) de Santé Canada a homologué pour une durée limitée la matière active de qualité technique, le champignon *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL), et sa préparation commerciale, SPORODEX L, mis au point par Plant Products Co Canada. Ces produits ont été examinés conjointement à titre de produits biopesticides dans le cadre du Programme d'examen conjoint du Groupe de travail technique d l'Accord de libre échange nord-américain (GTT ALENA) sur les pesticides par l'ARLA de Santé Canada et l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis. Des examens ont été partagés de façon officieuse avec la Netherlands Pesticide Regulatory Authority.

Le SPORODEX L est un fongicide biologique contenant 1,3 % (p/p) de la souche PF-A22 UL du champignon *Pseudozyma flocculosa*, destiné à lutter contre le blanc sur les roses et concombres cultivés en serre. Le microorganisme actif, *Pseudozyma flocculosa*, est un champignon d'origine naturelle et représente un biopesticide pour homologation aux États-Unis et au Canada.

On étudie de plus en plus les agents de lutte antiparasitaire microbiens pour remplacer les pesticides conventionnels en raison du fait que l'on croit qu'ils représentent un risque moins important pour la santé humaine et pour l'environnement. Le biopesticide SPORODEX L pourrait remplacer les fongicides chimiques.

Une des conditions de cette homologation de durée limitée est que la compagnie Plant Products Co. fournisse des renseignements de confirmation. Une fois que ces nouvelles données auront été examinées, l'ARLA publiera un projet de décision réglementaire et invitera les parties intéressées à soumettre leurs commentaires avant de procéder à une décision réglementaire définitive.

Table des matières

1.0 Le microorganisme actif, ses propriétés et ses utilisations 1
1.1 Description du microorganisme actif et de la préparation contenant ce microorganisme 1
1.2 Propriétés physiques et chimiques du produit technique et de la préparation commerciale 2
1.3 Détails relatifs aux utilisations et renseignements supplémentaires 3

2.0 Méthodes d'analyse 4
2.1 Méthodes d'analyse du microorganisme produit 4
2.1.1 Méthodes d'identification du microorganisme 4
2.1.2 Méthodes de détermination de la pureté des reproducteurs 5
2.1.3 Méthodes de détermination du contenu en microorganisme dans le produit obtenu en vue de la fabrication de la formulation 6
2.1.4 Méthodes de détermination des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué 6
2.1.5 Méthodes utilisées pour montrer l'absence de tout pathogène humain et mammifère 7
2.1.6 Méthodes de détermination de la stabilité à l'entreposage et de la durée de vie du microorganisme 7
2.2 Méthodes de détermination et de quantification des résidus (viables ou non viables) du microorganisme actif et de ses métabolites pertinents 7

3.0 Effets sur la santé humaine et animale 8
3.1 Sommaire intégré de la toxicité 8
3.2 Hypersensibilité 9
3.3 Effets sur la santé humaine et animale de l'exposition à la matière active ou à ses impuretés 10
3.3.1 Évaluation de l'exposition professionnelle et occasionnelle 10

4.0 Résidus 11
4.1 Sommaire des résidus 11
4.2 Limites maximales de résidus 12

5.0 Comportement et devenir dans l'environnement 12

6.0 Effets sur les espèces non visées 12
6.1 Sommaire intégré d'écotoxicologie 12

7.0 Efficacité 13
7.1 Effet utile 13
7.1.1 Utilisations prévues 13
7.1.2 Mode d'action 14
7.1.3 Cultures 14
7.1.4 Efficacité contre les organismes nuisibles 14
7.1.5 Volume total de pulvérisation 16
7.2 Phytotoxicité pour les plantes visées (y compris différents cultivars) ou pour les produits de plantes visées 16
7.3 Observations d'effets secondaires indésirables ou non voulus, par exemple sur des organismes utiles et autres organismes non visés, sur des cultures successives, sur d'autres plantes ou parties traitées utilisées à des fins de propagation (par exemple, semences, coupes, stolons) 16
7.3.1 Effets sur les cultures successives 16
7.3.2 Effets sur les cultures adjacentes 16
7.3.3 Effets sur la viabilité des semences 17
7.4 Économie 17
7.5 Pérennité 17
7.5.1 Recensement des solutions de rechange 17
7.5.2 Compatibilité avec les pratiques de gestion courantes, y compris la LI 19
7.5.3 Contribution à la réduction des risques 19
7.5.4 Information sur la possibilité de développement de résistance 20
7.6 Conclusions 20
7.6.1 Sommaire 20

8.0 Politique de gestion des substances toxiques 21

9.0 Décision réglementaire 22

Liste des abréviations 23

Annexe I Tableaux sommaires 25

1.0 Le microorganisme actif, ses propriétés et ses utilisations

1.1 Description du microorganisme actif et de la préparation contenant ce microorganisme

Tableau 1.1-1 Détermination de la matière active de qualité technique (MAQT)

Microorganisme actif	*Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL)
Utilité	Fongicide biologique
Nom scientifique : Rang taxonomique : Royaume : Phylum : Genre : Espèce : Souche :	*Pseudozyma flocculosa* (TRAQUAIR, J. A., SHAW, L. A., et W.R. Jarvis.) BOEKHOUT, T. et J.A. TRAQUAIR, souche PF-A22 UL. Champignons Deuteromycotina Champignon asexuel du groupe des dématiacés *Pseudozyma* *flocculosa* PF-A22 UL
Renseignements relatifs à un brevet canadien	Un brevet a été accordé au nom de Sa Majesté aux droits du Canada tel que représenté par le ministre de l'Agriculture, la compagnie Plant Products Co. Ltd étant le détenteur de la licence. Numéro de série du brevet canadien : 2,011,705 Émis : 1999/06/15 Expiration : 2010/03/07 Titre : MÉTHODE ET COMPOSÉ POUR LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MALADIES DES VÉGÉTAUX
Pureté nominale de la matière active	La souche PF-A22 UL de l'organisme *Pseudozyma flocculosa* (MAQT) est composé à 100 % de matière active en milieu de fermentation épuisé correspondant à un minimum de 3×10^8 cellules souches unipotentes (CFU)/mL de la souche PF-A22 UL du champignon *Pseudozyma flocculosa*. 1,3 % p/p (équivalent à un minimum de 3×10^8 CFU/mL) dans le SPORODEX L (Préparation commerciale (PC)).

Nature des impuretés pertinentes d'importance toxicologique, environnementale et autre	Le produit de qaulité technique ne contient aucune impureté ni de micropolluants figurant sur la liste des substances de la voie 1 de la Politique de gestion des substances toxiques (PGST). Une culture est rejetée si l'activité biologique est modifiée ou si l'on détecte la présence de mutations. Le milieu est jeté s'il contient toute trace de contamination avant l'inoculation. Le produit est jeté si le niveau de contamination dépasse le critère d'acceptation relatif à la teneur totale en flore aérobie (<1000 CFU/mL), en entérobactéries (<10 CFU/mL), en streptococces fécaux (absence dans 1 g), en *Staphylococcus aureus* (absence dans 1 g), en coliformes (<10 CFU/mL), en *Escherichia coli* (absence dans 1 g) et en *Salmonella* (absence dans 1 g). La souche PF-A22 UL ne produit aucune toxine connue actives contre les mammifères.

1.2 Propriétés physiques et chimiques du produit technique et de la préparation commerciale

Tableau 1.2-1 Produit de qualité technique : *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL)

Sans objet. Le produit SPORODEX L est fabriqué selon un procédé continu dans lequel aucun produit intermédiaire ou produit technique indépendant n'est produit.

Tableau 1.2-2 Préparation commerciale : SPORODEX L

Propriété	SPORODEX L
État physique à 25 °C	Liquide
Couleur	Beige
Odeur	Faible odeur de champignon
pH dans l'eau distillée	6,4 – 6,8
Densité	1,05 g/mL
Viscosité	51 centipoises
Corrosivité	Aucune

Tous les produits de préparation du Sporodex L sont soit de qualité alimentaire, soit considérés relativement non toxiques (c.-à-d., liste 3, 4A ou 4B de l'EPA). La préparation commerciale ne contient aucun produit de préparation, contaminant ou impureté satisfaisant les critères de la voie 1 de la PGST.

1.3 Détails relatifs aux utilisations et renseignements supplémentaires

Le SPORODEX L est une préparation commerciale contenant la matière active *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL). Le SPORODEX L est un liquide destiné à être utilisé comme fongicide biologique pour lutter contre les champignons du blanc (les champignons *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* et *Sphaerotheca fuliginea*) sur les cultures alimentaires en serre (catégorie d'utilisation 5) et les cultures non alimentaires en serre (catégorie d'utilisation 6), notamment les concombres et les roses. Le SPORODEX L doit être utilisé sous forme de solution aqueuse préparée en diluant 500 mL du produit en 100 L d'eau (équivalent à approximativement 10^5 à 10^6 CFU/mL). On y ajoute un agent mouillant à une concentration finale de 0,02 % pour améliorer son efficacité. Les plantes doivent être traitées dès que les conditions environnementales sont propices pour la croissance du blanc ou dès le premier signe de la maladie. Les plantes doivent être traitées par pulvérisation jusqu'au point d'écoulement à des intervalles d'une semaine. On peut utiliser jusqu'à 1500 L de la solution de pulvérisation par hectare dans le cas des roses coupées ou des concombres, ou environ 1000 L/ha dans le cas des plantes en pot. L'humidité relative doit être maintenue à plus de 70 % pendant 12 heures après la pulvérisation du produit.

Le champignon *Pseudozyma flocculosa* a été isolé en 1986 des feuilles du trèfle des prés, *Trifolium pratense*, infecté du blanc, *Erysiphe polygoni*, par des chercheurs d'Agriculture et agroalimentaire Canada, à Harrow (Ontario). Au début, on avait identifié cet organisme erronément, croyant qu'il s'agissait d'une nouvelle levure ascomycète ayant un état anamorphique dans le genre répandu *Sporothrix* et un état téléomorphique dans le genre *Stephanoascus*. Son taxon a été modifié en 1995 à *Pseudozyma flocculosa* suite à une analyse d'ADN ribosomique. Le genre *Pseudozyma* contient d'autres anamorphiques semblables à la carie, incluant le *P. rugulosa* (anciennement *Sporothrix rugulosa*). Le *Pseudozyma flocculosa* est une phyllosphère épiphyte et un hyperparasite principalement du blanc, mais il a été isolé en association avec d'autres moisissures de la surface des feuilles. Il est très répandu en Amérique du Nord (le Canada et les États-Unis), ainsi qu'en Europe sur les surfaces aériennes des plantes dans les champs et dans les écosystèmes agricoles en serre.

Le *Pseudozyma flocculosa* présente une résistance à plusieurs différents champignons responsables du blanc (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, *Sphaerotheca fulginea*, *Erysiphe graminis* var. *tritici* et *Erysiphe polygoni*) sur plusieurs différentes plantes cultivées en serre ou dans les champs lorsque l'humidité relative est supérieure ou égale à 70 %. Ce champignon est un mycoparasite nécrotrophe qui tue les cellules hôtes cibles sensibles lorsqu'il est en contact ou à proximité de celles-ci. La mort rapide et le collapsus des cellules hôtes surviennent sans pénétration en raison de la sécrétion de trois acides gras C-17 non saturés fongitoxiques (acide 9-heptadécanoïque, acide 6-méthyle-9-heptadécanoïque et acide 4-méthyle-7,11-heptadécadiénoïque) et d'un norterpène acyclique (2, 6, 10, 14, 18-pentaméthyle-2, 6, 8, 10, 12, 14, 17-nonadécaheptène-1,19-diol). Les fongitoxines perturbent les membranes plasmiques et les organelles cytoplasmiques sensibles dans les 30 minutes suivant l'exposition. La réaction inhibitrice

comprend la perte de protéines et d'électrolytes. Après 24 heures, les cellules hôtes s'affaissent rapidement et meurent en raison de l'activité des fongitoxines sur les membranes cellulaires et lipides des cellules hôtes. La sensibilité aux acides gras libres C-17 non saturés est liée à un niveau élevé de non saturation des acides gras phospholipides et une faible proportion de stérols.

2.0 Méthodes d'analyse

2.1 Méthodes d'analyse du microorganisme produit

2.1.1 Méthodes d'identification du microorganisme

Le demandeur d'homologation a présenté des méthodes détaillées efficaces pour la détection, l'isolement et l'énumération de *P. flocculosa* (souche PF-A22 UL). On identifie l'agent de lutte antiparasitaire microbien (ALAM) à l'aide d'une combinaison de traits morphologiques, de méthodes moléculaires et de son activité biologique.

L'identification des organismes *Pseudozyma* au niveau de l'espèce s'effectue à l'aide d'une méthode mycologique normalisée. On peut distinguer les différentes espèces du genre *Pseudozyma* des autres espèces similaires sur le plan de la morphologie comme *Hyalodendron*, *Tilletiopsis*, *Sporobolomyces* et *Sporothrix*. Il est possible de confondre les conidiophores ramifiés des espèces du genre *Pseudozyma* avec ceux produits par *Hyalodendron*; cependant, les hydrolysats des cellules entières de ce basidiomycètes filamenteux contiennent du xylose, que l'on ne retrouve pas chez *Pseudozyma*. *Tilletiopsis* et *Sporobolomyces* (d'autres levures sauvages saprophytes que l'on trouve sur les surfaces aériennes des plantes, diffèrent de *Pseudozyma* du fait qu'elles produisent des spores qui sont déchargées de force lors de la sporulation [ballistospores]). De plus, les espèces du genre *Tilletiopsis* produisent une glucanase β-1,3 qui dégrade les champignons, tandis que les espèces du genre *Pseudozyma* ne produisent pas cette substance. Le genre *Sporothrix* représente un groupe de levures ascomycétiques anamorphiques comme la *Sporothrix schenckii* (type), un pathogène animal. Sur le plan de la physiologie, les espèces du genre *Pseudozyma* diffèrent beaucoup de celles du genre *Sporothrix*. À la différence des anamorphiques ascomycétiques du genre *Sporothrix*, *P. flocculosa* réagit positivement lors des essais de réaction avec le bleu B de diazonium et l'uréase, comme le font typiquement toutes les levures basidiomycétiques. De plus, l'ubiquinone principal est de forme Q-10, plutôt que de forme Q-8 ou Q-9, ce qui est typique des ascomycètes, *Saccharomycopsis* et *Stephanoascus*.

On peut distinguer la souche PF-A22 UL des autres souches de *P. flocculosa* à l'aide d'une méthode basée sur l'ADN appelée la réaction d'amplification en chaîne par polymérase multiplex (PCR multiplex). Le système de PCR multiplex est essentiellement un mélange de différentes amorces qui permet d'évaluer rapidement les nombreux fragments d'ADN dans une seule amplification par PCR. Le protocole est fondé sur l'amplification de deux régions nucléaires, (ITS et NS), et d'une région mitochondrienne

(ML). On a découvert que ces régions permettent d'identifier la souche PF-A22 UL de l'organisme *P. flocculosa* par discrimination.

On emploie deux méthodes pour assurer l'intégrité et la constance de l'AMLA. La première méthode consiste en une technique de PCR basée sur l'ADN que l'on appelle la PCR à amplification aléatoire des microsatellites (RAMS). Les microsatellites sont des régions non codantes hypervariables de l'ADN du génome qui évoluent plus rapidement que l'ADN codante. L'autre méthode est une analyse qui permet de mesurer l'activité biologique. On mesure l'activité biologique de l'AMLA par la zone d'inhibition créée lorsque l'on fait pousser un organisme sensible à proximité. Étant donné que le parasite ciblé (espèce du genre *Sphaerotheca*) est un biotrophe obligatoire, on ne peut l'utiliser directement dans cette analyse biologique. Au lieu de cela, on emploie une espèce du genre *Phomopsis*, parce qu'elle a une sensibilité similaire aux sécrétions fongitoxiques de *P. flocculosa*.

2.1.2 Méthodes de détermination de la pureté des reproducteurs

La colonie mère est conservée sous forme de cultures inclinées à 4 °C, et sous forme de cultures séchées à froid entreposées à −20 °C. On vérifie la stabilité génétique de ces cultures au moins une fois tous les six mois à l'aide de PCR RAMS (voir la section 2.1.1 pour les détails). On doit augmenter la fréquence d'exécution de cette analyse en conséquence si le rendement de la colonie mère commence à diminuer.

Aucune méthode de détermination de la pureté des colonies mères n'a été déposée. Cependant, on a proposer un nombre suffisant d'épreuves de sélection des contaminants microbiens pour la production de la souche PF-A22 UL de *Pseudozyma flocculosa* et du SPORODEX L. On emploie essentiellement trois genres d'épreuves de sélection dans la production de la souche PF-A22 UL de *Pseudozyma flocculosa* et du SPORODEX L, notamment les essais de stérilité à la préfermentation, les essais d'intégrité de l'AMLA, et les épreuves de sélection pour contaminants.

Avant l'inoculation, tous les milieux de croissance sont analysés pour déterminer la présence de contaminants microbiens en déposant des aliquotes du milieu sur des plaques de gélose pour dénombrement sur plaque. Les milieux de croissance contaminés par des microbes sont jetés. De façon similaire, l'intégrité de l'AMLA et la contamination microbienne de toutes les cultures sont contrôlées en déposant différentes dilutions sur des plaques de gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA). Si l'on décèle une importante contamination microbienne, la culture est rejetée. Dans le cas d'une morphologie anormale des colonies sur les plaques PDA, on effectue une analyse PCR multiplex (voir la section 2.1.1 pour les détails), afin de bien identifier les colonies touchées. De plus, on exécute l'analyse biologique décrite à la section 2.1.1 avant de préparer le produit afin de vérifier son potentiel de lutte biologique. On soumet la préparation commerciale à des épreuves de sélection avant son emballage. La préparation commerciale est contrôlée en faisant la culture de dilutions de préparations commerciales sur ou dans différents milieux de culture. Les groupes de contaminants microbiens

analysés, ainsi que leurs critères d'acceptation proposés comprennent, entre autres, la flore aérobie totale (<1000 CFU/mL), les entérobactéries (<10 CFU/mL), les streptocoques fécaux (absence dans 1 g), le *Staphylococcus aureus* (absence dans 1 g), les coliformes (<10 CFU/mL), l'*Escherichia coli* (absence dans 1 g) et le *Salmonella* (absence dans 1 g). Le lot de production en entier est rejeté si l'une des limites de biocontamination proposées quelconques n'est pas respectée.

2.1.3 Méthodes de détermination du contenu en microorganisme dans le produit obtenu en vue de la fabrication de la formulation

Pour déterminer la concentration de *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL), on mesure le nombre de cellules souches unipotentes (CFU) par millilitre de préparation commerciale. Pour effectuer cet essai, on dilue un échantillon de 25 mL dans la peptone, puis on l'applique à une plaque PDA. On fait des observations microscopiques de la préparation commerciale pour s'assurer que l'AMLA est de la bonne forme (conidiale). Selon les spécifications du produit, la garantie est exprimée comme étant supérieure à 3×10^8 CFU/mL. Le potentiel de lutte biologique de l'AMLA est mesuré avant de formuler le produit à l'aide de l'analyse biologique décrite à la section 2.1.1.

2.1.4 Méthodes de détermination des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué

Aucune matière toxique connue ou soupçonnée n'est produite par le *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL) pendant la fermentation. Même si le procédé de fabrication est conçu en grande partie pour éviter la contamination microbienne, la préparation commerciale peut devenir contaminée pendant les étapes de centrifugation et de préparation dans des conditions non stériles. Comme mentionné à la section 2.1.2, il existe différentes méthodes pour surveiller le niveau des différents groupes de microorganismes pouvant contaminer la formulation.

On a évalué les données de contrôle de la qualité de cinq lots (dont 1 d'échelle commerciale et 4 d'échelle pilote) de SPORODEX L à l'aide des épreuves de sélection décrites à la section 2.1.1. La teneur totale en flore aérobie dans le SPORODEX L allait de 150 à 2×10^4 CFU/mL. Le nombre d'entérobactéries et de coliformes fécaux était de 0 CFU/mL dans les deux cas, et aucun enterocoques, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, ou *Salmonella* ont été détectés dans le SPORODEX L. On doit noter que deux des cinq lots, y compris le seul lot commercial, ont été détruits en raison de contamination microbienne. Dans un de ces lots, la teneur totale en flore aérobie dépassait le critère d'acceptation du produit pour ce groupe de contaminants, c'est-à-dire, $<10^3$ CFU/mL. Dans l'autre lot, on a détecté une importante contamination microbienne pendant un essai d'intégrité de l'AMLA sur PDA. Ces deux lots ont été rejetés.

Étant donné que deux lots ont été détruits en raison de contamination microbienne, le demandeur d'homologation devra soumettre des certificats d'analyse pour tous les lots de SPORODEX L afin de satisfaire aux conditions d'homologation de l'ARLA et de l'EPA des États-Unis.

2.1.5 Méthodes utilisées pour montrer l'absence de tout pathogène humain et mammifère

Comme mentionné à la section 2.1.2, le programme d'assurance de la qualité mis en oeuvre par le demandeur d'homologation pour la production du SPORODEX L exige la destruction du lot en cas de non respect des critères relatifs à l'acceptation de la formulation (y compris les critères relatifs aux pathogènes animaux et humains).

2.1.6 Méthodes de détermination de la stabilité à l'entreposage et de la durée de vie du microorganisme

Les données sur la stabilité du produit sont nécessaires pour assurer le rendement et la sûreté du produit. Les données comprises dans la soumission étaient dérivées d'un seul lot de SPORODEX L sur une période de 11 mois à -20 °C. Des données supplémentaires sur la stabilité à l'entreposage dérivées d'au moins cinq lots d'échelle commerciale ou d'échelle pilote sont nécessaires pour appuyer les allégations indiquées sur l'étiquette et assurer le rendement et la sûreté du produit. Le produit doit porter une date d'expiration de trois mois à partir de la date de fabrication, jusqu'à ce qu'on ait produit d'autres données.

2.2 Méthodes de détermination et de quantification des résidus (viables ou non viables) du microorganisme actif et de ses métabolites pertinents

Bien que les espèces du genre *Pseudozyma* soient répandues dans la nature et ont été isolées à partir d'une grande variété de surfaces végétales, incluant les feuilles mortes, le trèfle, le maïs et les concombres, aucun effet nocif n'a été attribué à des populations naturelles de *P. flocculosa*. Étant donné qu'aucun effet nocif n'a été signalé dans les études de toxicité/pathogénicité orale aiguë, et qu'aucune publication n'indique que *Pseudozyma* (*Sporothrix*) *flocculosa* produit des toxines actives contre les mammifères, il n'est pas nécessaire d'établir une limite maximale de résidus (LMR) pour l'organisme *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL). Par conséquent, aucune méthode de quantification de résidus de *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL) dans les aliments et les aliments pour animaux n'est nécessaire.

Les méthodes analytiques de détection de résidus viables de *Pseudozyma flocculosa* dans les tissus des animaux et des humains exigent le mélange des tissus et le recouvrement sur extraits de malt gélosé de levures (YM) ou sur le milieu gélosé de Martin (MA). Si nécessaire, on peut effectuer une analyse par PCR multiplex (voir la section 2.1.1 pour les détails) pour distinguer la souche PF-A22 UL des autres souches de *P. flocculosa*.

3.0 Effets sur la santé humaine et animale

Voir le tableau I de l'annexe I pour le sommaire.

3.1 Sommaire intégré de la toxicité

Les documents soumis par la compagnie Plant Products Co. en vue de l'homologation de la MAQT *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL) et la préparation commerciale SPORODEX L, ont été examinés du point de vue de la santé et de la sécurité humaine et ont été jugés suffisamment complets pour arriver à une décision concernant l'homologation. Les renseignements fournis pour aborder la question de la caractérisation de la matière active ainsi que celle du procédé de fabrication et du contrôle de la qualité étaient suffisants pour répondre aux questions concernant la santé et la sécurité humaine liées à l'organisme *P. flocculosa* (souche PF-A22 UL) et les contaminants bactériens et fongiques introduits pendant la fabrication.

Le produit SPORODEX WP, une poudre mouillable, n'a montré aucun signe de toxicité ou de pathogénicité lorsque administré aux rats par voie orale.

L'administration intratrachéale de *P. flocculosa* a mené à un nombre considérable de décès spontanés chez les animaux exposés à une substance à l'essai (SE) et à une substance morte à l'essai (SME). La présence de l'organisme à analyser dans l'estomac et dans l'intestin grêle indique la possibilité d'une erreur de dosage. Dans une deuxième étude pulmonaire, aucun décès n'a eu lieu mais des cas de pelage de poils rugueux liés à la dose ont eu lieu. En se basant sur cette étude, on a classé l'organisme *P. flocculosa* dans la catégorie légèrement toxique. Cette étude était considérée supplémentaire parce que l'infectiosité n'a pas été évaluée et parce que la substance analysée n'était pas la MAQT recommandée. L'étiquette doit être améliorée en y ajoutant un énoncé indiquant l'utilisation obligatoire de respirateurs par tous les utilisateurs et une étude complète de toxicité/infectiosité pulmonaire aiguë doit être effectuée, utilisant la MAQT et le filtrat stérile de la culture de production.

On a déterminé que le *Pseudozyma flocculosa* est légèrement toxique mais pas pathogène lorsque administré aux rats par injection intrapéritonéale. L'organisme n'a causé aucune mort ni symptôme clinique indésirable. On a signalé des nodules blancs et une masse légèrement élevée de la rate lors de la nécropsie, qui ont été attribués à une réaction immunitaire normale à une substance étrangère. La masse corporelle des rats mâles exposés à une SE était plus faible, malgré une plus grande consommation de nourriture, ce qui indique que le *P. flocculosa* est légèrement toxique. L'élimination de l'organisme à l'essai a eu lieu dans une période de 7 jours, indiquant l'absence de pathogénicité.

Le *Pseudozyma flocculosa* n'était pas toxique ni irritant lorsque administré par voie cutanée aux lapins. Une justification d'exemption a été déposée pour aborder la question de la possibilité de toxicité et/ou d'irritation des composés de formulation du produit SPORODEX L. Tous les composés de formulation sont soit de la catégorie alimentaire,

soit relativement non toxiques. Un des composés de formulation peut causer de l'irritation si il est en contact avec la peau pendant une période prolongée. Les exigences relatives à l'équipement de protection individuelle ordinaire sont adéquates.

On a observé une légère rougeur de la conjonctive après administration du produit SPORODEX WP aux yeux de lapins. On s'attend à ce que le pouvoir irritant du produit SPORODEX L soit moindre que celui du SPORODEX WP. Les énoncés ordinaires indiquant aux utilisateurs d'éviter le contact avec les yeux sont suffisants.

On n'a signalé aucune production de toxine active contre les mammifères par le *Pseudozyma flocculosa*. Le demandeur d'homologation a joint à sa demande les résultats d'une recherche informatique de la documentation utilisant différents mots clés comme pseudozyma*, tilletiopsis, fate, non target, carcin*, mutagen*, toxic*, pathogen*, antibiotic*, polyen*, sporothrix, sporobolomyces, rhodotorula, phyllosphere yeast*, carcinog* et teratogen*. Les bases de données *AGRICOLA*, Biological Abstracts, CAB Abstracts, CHEMTOX, RTEX et AGRIS de 1980 à 1999 ont été consultées. Il n'y a aucune indication de toxicité contre les mammifères dans les résumés biologiques, chimiques et toxicologiques conformes consultés.

On n'a pas observé de survie, de réplication, d'infectiosité, de toxicité importante ni de persistance de la MAQT dans les animaux expérimentaux traités lors des essais de toxicité/infectiosité orale aiguë, pulmonaire et intraveineuse de niveau I. Par conséquent, les essais de niveau supérieur (subchronique et chronique, oncogénicité, mutagénicité et tératogénicité) n'ont pas été nécessaires, étant donné l'absence d'inquiétudes suivant l'analyse des résultats des essais de niveau I.

La matière active, *P. flocculosa* (souche PF-A22 UL), n'est pas un pathogène humain, ni un perturbateur du système endocrinien connu. Les études de toxicité/pathogénicité chez les rongeurs déposés par le demandeur indiquent que, suivant plusieurs voies d'exposition, le système immunitaire est toujours intact et capable de traiter et d'éliminer la matière active. Or, aucun effet nocif sur le système endocrinien ou immunitaire n'est connu ou prévu.

3.2 Hypersensibilité

Le demandeur d'homologation n'a déposé aucune étude sur la sensibilité de la peau à la matière active microbienne, *P. flocculosa*, puisque les études d'hypersensibilité ne sont pas exigées par l'ARLA pour l'homologation des agents de lutte antiparasitaire microbiens. On ne peut substituer les études de sensibilisation de la peau aux rapports opportuns d'incidents d'hypersensibilité après l'approbation de l'homologation.

Les chercheurs ayant travaillé de près avec le *P. flocculosa* (souche PF-A22 UL) pendant jusqu'à 10 ans n'ont signalé aucun effet nocif attribuable à cette matière. Le demandeur d'homologation a déposé une justification d'exemption des études de sensibilisation cutanée basée sur la supposition que la plupart des microorganismes contiennent des

substances pouvant provoquer une réaction d'hypersensibilité. Le *Pseudozyma flocculosa* est considéré comme une substance sensibilisante potentielle, par conséquent les panneaux indicateurs principaux des étiquettes de la matière active de qualité technique et de la préparation commerciale doivent porter la mention « SENSIBILISANT POTENTIEL ». L'utilisation d'équipement de protection individuelle sera également obligatoire pour pallier la possibilité de sensibilisation de la peau chez les travailleurs/manutentionnaires qui sont exposés au produit dans le cadre de leurs fonctions. Comme condition d'homologation, le demandeur doit signaler toute indication subséquente d'hypersensibilité ou autre incidence sur la santé des travailleurs, des opérateurs antiparasitaires, ou des tiers, exposés à l'AMLA. Les rapports d'accident doivent comprendre les détails comme une description de l'AMLA et de ses composés de formulation, la fréquence, la durée et les voies d'exposition à la matière, les observations en clinique et tout autre renseignement pertinent.

3.3 Effets sur la santé humaine et animale de l'exposition à la matière active ou à ses impuretés

3.3.1 Évaluation de l'exposition professionnelle et occasionnelle

L'exposition professionnelle est spécialement inquiétante, étant donné que le produit est utilisé dans un milieu fermé. L'ARLA ne prévoit pas que l'exposition professionnelle présente un risque exagéré, étant donné le profil de toxicité/pathogénicité peu élevée du *P. flocculosa*, pourvu que les énoncés de précaution figurant sur les étiquettes soient respectés. Lorsque le produit est manié selon les instructions de l'étiquette, l'exposition professionnelle et occasionnelle peut se produire par voie pulmonaire, cutanée ou oculaire.

L'exposition cutanée est la principale voie d'exposition des manipulateurs du produit. Comme une peau intacte constitue un obstacle naturel à l'invasion microbienne du corps humain, l'absorption cutanée ne peut se produire que si la peau est coupée, si le microbe est un pathogène muni de mécanismes lui permettant de pénétrer dans le corps par une infection de la peau, ou si des métabolites pouvant être absorbés par la peau sont produits. Le *Pseudozyma flocculosa* n'est pas un pathogène humain connu et ne produit pas de métabolites pouvant être absorbés par la peau. En se basant sur les effets nocifs d'importance minime rencontrés pendant l'étude intrapéritonéale, l'ARLA est de l'avis que même une peau coupée ne présente aucun risque important pour la santé par l'absorption de *P. flocculosa* dans le corps. Bien que l'on ait déterminé que l'AMLA est non toxique et non irritant par exposition cutanée, il s'agit d'un sensibilisant potentiel. Des restrictions relatives à l'étiquetage et des mesures de lutte contre le risque sont nécessaires pour protéger les populations de personnes qui risquent d'être exposées le plus au pesticide. Une telle exposition des manutentionneurs de pesticides peut être réduite par le port de chemises à manches longues, de pantalons longs, de chaussures et de chaussettes.

L'inhalation est une autre voie d'exposition pour les manipulateurs de mélangeurs/chargeurs et possiblement pour les travailleurs qui retournent tôt sur le terrain. En se basant sur les résultats de l'étude pulmonaire dans laquelle on a observé des lésions sur les poumons de quelques animaux traités, les manipulateurs de pesticides doivent porter un respirateur à filtre à poussières/brouillards respectant les normes N–95, R-95, P-95 ou HE du National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) pour produits biologiques. Un délai de sécurité de quatre heures est également obligatoire pour les travailleurs qui retournent tôt sur le terrain et pour les autres personnes entrant dans les serres traitées.

Le SPORODEX WP est un faible irritant des yeux de lapins, et, en se basant sur la nature de ses composés de formulation, on prévoit que le SPORODEX L sera moins irritant. Il n'est pas nécessaire de porter de l'équipement de protection des yeux.

Selon les indications de l'étiquette, le produit ne doit pas être utilisé sur le gazon en plaques, les zones résidentielles et les zones récréatives. Étant donné que le produit est destiné à être utilisé dans les serres, on prévoit que l'exposition sera minime ou nulle pour les nourrissons et aux enfants dans les établissements d'enseignement, les résidences et les garderies. Par conséquent, on prévoit que les risques pour la santé des nourrissons et des enfants seront négligeables ou nuls.

4.0 Résidus

4.1 Sommaire des résidus

Selon son mode d'emploi proposés, le SPORODEX L sera appliqué par pulvérisation sur le feuillage des rosiers et des plantes de concombres. Il est probable que le mode d'emploi proposé sur les aliments donnera lieu à des résidus sur les aliments destinés à la consommation humaine et animale. Il est cependant probable que les résidus du pesticide microbien soient enlevés des aliments traités par le lavage, le pelage, la cuisson et la transformation. Même si les résidus ne sont pas enlevés, il est peu probable que l'exposition par voie alimentaire à l'agent microbien présente un risque exagéré pour les consommateurs, parce qu'aucun effet nocif n'a été observé aux doses maximales dans l'étude de toxicité aiguë par voie orale de niveau I. De plus, une recherche approfondie de la documentation n'a révélé aucun cas de production de toxines actives contre les mammifères par le *P. flocculosa* (voir la section 3.1). On n'a pas signalé que les acides gras C-17 non saturés fongitoxiques et le norterpène acyclique, produits par l'AMLA, sont toxiques pour les mammifères. Ni cet organisme, ni ses parents proches, font partie de la catégorie des contaminants microbiens des aliments.

Comme l'étude de toxicité aiguë par voie orale de niveau I a démontré un faible niveau de toxicité et n'a démontré aucune pathogénicité du microorganisme actif, les études d'exposition subchronique et chronique dans le régime alimentaire ne sont pas nécessaires. Il n'y a pas de risques chroniques d'exposition dans le régime alimentaire des

sous-populations sensibles, comme les nourrissons et les enfants, en raison du faible profil de toxicité et du faible potentiel d'exposition de l'AMLA.

Bien que le *P. flocculosa* puisse être transporté dans les milieux aquatiques voisins par de fortes pluies, la croissance et la survie des champignons terrestres comme le *P. flocculosa* sont limitées dans de tels milieux. Il est donc peu probable qu'il se reproduise dans les habitats aquatiques à la suite d'incidents d'exposition directe ou indirecte (par exemple, l'écoulement des serres traitées). D'ailleurs, l'organisme *P. flocculosa* n'est pas considéré comme un risque pour l'eau potable. Par conséquent, l'eau potable n'est pas analysée spécifiquement pour déterminer la présence de *P. flocculosa* comme indicateur possible de contamination microbienne ou comme contaminant pathogène direct. La percolation dans le sol et le traitement de l'eau potable par les municipalités réduiraient tous les deux la possibilité du transfert d'une importante quantité de résidus à l'eau potable. La possibilité d'exposition et de risque par ingestion d'eau potable est donc probablement minime ou nulle pour cet AMLA.

4.2 Limites maximales de résidus

Malgré le fait que les espèces du genre *Pseudozyma* sont très répandues dans la nature et ont été isolées à partir d'un grand éventail de surfaces végétales, incluant les couches de feuilles mortes, le trèfle, le maïs et le concombre, aucun effet nocif par exposition dans le régime alimentaire n'a été attribué à des populations naturelles de *P. flocculosa*. D'ailleurs, aucun effet nocif n'a été observé dans l'étude de toxicité/pathogénicité aiguë orale, et on n'a signalé la production d'aucune toxine connue active contre les mammifères par l'AMLA. Il n'est donc pas nécessaire de définir une limite maximale de résidus (LMR) pour la souche PF-A22 UL de *P. flocculosa* en vertu du paragraphe 4(d) de la *Loi sur les aliments et drogues* (falsification des produits alimentaires) tel que défini sous la section 15, article B.15.002 du *Règlement sur les aliments et drogues*.

5.0 Comportement et devenir dans l'environnement

Les données sur le devenir dans l'environnement (niveau II) n'ont pas été déclenchées, puisqu'on ne prévoit aucun effet nocif sur les organismes non visés de l'utilisation en serre proposée de *P. flocculosa* (souche PF-A22 UL).

6.0 Effets sur les espèces non visées

Voir le tableau II de l'annexe I pour le sommaire.

6.1 Sommaire intégré d'écotoxicologie

Des exemptions acceptables ont été déposées pour satisfaire les exigences relatives à l'écotoxicologie. On ne prévoit pas que les organismes non visés, incluant les oiseaux, les mammifères sauvages, les poissons d'eau douce, les arthropodes aquatiques et terrestres, les invertébrés ne faisant pas partie du groupe des arthropodes, et les plantes aquatiques et

terrestres, soient exposés davantage au *P. flocculosa* en raison de l'utilisation de SPORODEX L dans les serres commerciales. On ne signale pas dans la documentation d'effet nocif sur ces organismes non visés. Les études visant à évaluer les effets de *P. flocculosa* sur ces organismes ne sont pas nécessaires.

L'organisme *Pseudozyma flocculosa* est un épiphyte fongique saprophyte et un hyperparasite du blanc. Le collapsus des cellules hôtes sensibles et la mort rapide surviennent en raison de la sécrétion de trois acides gras C-17 non saturés fongitoxiques et d'un norterpène acyclique. Les fongitoxines perturbent les membranes plasmiques et les organelles cytoplasmiques sensibles, tandis que le nortorpène exerce peu de pouvoir antifongique. Malgré le mode d'action lié au *P. flocculosa*, sa gamme d'hôtes se limite principalement aux organismes responsables du blanc (par exemple, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, *S. fulginea*, *Erysiphe graminis* var. *tritici* et *E. polygoni*). Bien que les essais biologiques in vitro aient démontré que les champignons du sol comme les espèces des genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* et *Rhizoctonia*, et certaines bactéries Gram négatif (par exemple, *Xanthomonas campestris*) et Gram positif (par exemple, *Bacillus subtilis*) sont faiblement ou modérément sensibles à *P. flocculosa*, ce dernier organisme étant une phyllosphère épiphyte et un organisme compétent non rhizosphère, on ne s'attend pas à ce qu'il ait un effet important sur les microorganismes du sol. Aucune analyse de ses effets sur les microorganismes non visés n'est nécessaire en raison de la gamme d'hôtes limitée de *P. flocculosa*.

Les produits de formulation dans la préparation commerciale, SPORODEX L, ne présentent pas de risques pour l'environnement lorsqu'ils sont utilisés dans les concentrations et aux doses d'application proposées pour la lutte contre le blanc sur les roses et concombres cultivés en serre. Par conséquent, le SPORODEX L devrait présenter peu de risques pour l'environnement lorsqu'il est utilisé selon les directives indiquées sur l'étiquette. De plus, l'étiquette du SPORODEX L ne doit porter aucun énoncé spécial de précaution ou de risque pour l'environnement.

7.0 Efficacité

7.1 Effet utile

7.1.1 Utilisations prévues

Pour la lutte contre le blanc dans les cultures de serre.
Mélanger 500 mL de SPORODEX L pour chaque 100 L d'eau. Ajouter un agent mouilleur à une concentration de 0,02 %.

Appliquer jusqu'à 1500 L d'eau par ha pour les roses coupées ou les concombres et jusqu'à 1000 L par ha pour les plantes en pot. Pulvériser le feuillage des plantes jusqu'à écoulement à des intervalles d'une semaine, dès que les conditions environnementales favorisent le développement du blanc, ou dès le premier signe de la maladie.
Maintenir l'humidité relative à plus de 70 % pendant 12 heures après l'application.

L'utilisation de fongicides chimiques en même temps que le SPORODEX peut inhiber l'activité de ce produit contre le blanc.

Garder congelé à une température de -20 °C ou moins dans le congélateur jusqu'à l'utilisation; laisser dégeler à la température de la pièce avant l'utilisation.

7.1.2 Mode d'action

Le produit SPORODEX L est une préparation liquide contenant du *Pseudozyma flocculosa* (synonyme : *Sporothrix flocculosa*) à une concentration de 3×10^8 CFU/mL. La souche de *P. flocculosa* sur laquelle est basé ce produit a été isolée du blanc sur des mauvaises herbes près de Harrow (Ontario) en 1988. Elle a un effet antagoniste sur la plupart des espèces de pathogènes responsables du blanc, et semble commune dans les milieux horticoles et agricoles où l'on retrouve le blanc. La gamme d'hôtes peut comprendre l'antagonisme contre les genres *Sphaerotheca* et *Erysiphe*, mais son activité est moindre contre les genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* et *Rhizoctonia* selon les essais biologiques effectués in vitro. Le *Pseudozyma* détruit l'intégrité des membranes des cellules hôtes par l'action du métabolisme des acides gras, provoquant des fuites dans les cellules, mais ne semble pas coloniser les hyphes hôtes. Les conditions optimales pour l'infection des champignons hôtes sont une température de 26 ° C et une humidité relative de plus de 70 %. Le *Pseudozyma* colonise les feuilles en absence du blanc mais ne se reproduit rapidement que lorsque cette maladie est présente.

7.1.3 Cultures

Le SPORODEX L est destiné à être utilisé sur les roses et les concombres cultivés en serre.

7.1.4 Efficacité contre les organismes nuisibles

On a procédé à onze essais de *Pseudozyma flocculosa* sur les concombres aux Pays-Bas et au Canada dans des serres de recherche ou commerciales. Les plantes ont été cultivées dans de la laine minérale selon les pratiques de production hydroponiques ordinaires. Le SPORODEX WP (deux préparations anciennes) ou le SPORODEX L ont été appliqués à des intervalles correspondant aux directives de l'étiquette à des plantes qui étaient habituellement inoculées de blanc (*Sphaerotheca* spp.) Des fongicides étalons disponibles dans le commerce ont été appliqués au besoin à des fins de comparaison. Le blanc (pourcentage de feuilles malades sur les plantes entières) a été évalué à des intervalles réguliers et la surface sous la courbe de la progression de la maladie a été préparée pour la saison entière afin de comparer les différents traitements. Les concombres ont été récoltés et classés, et le rendement total ou le rendement de qualité première ont été notés.

Dans sept essais avec les concombres, en se basant sur la quantité totale d'occurrence de la maladie au cours de la saison, on a obtenu un niveau de répression de 18 à 48 % avec le SPORODEX WP, ce qui différait de façon considérable du témoin mais était inférieur au

niveau de répression obtenu avec les fongicides chimiques (44 à 66 %). Dans deux essais comparatifs effectués dans des conditions de maladie modérée, une préparation plus récente de SPORODEX WP était considérablement plus efficace (>56 %) que le témoin et l'ancienne préparation, qui n'était pas efficace. Le rendement des concombres traités au SPORODEX était généralement plus élevé que celui du témoin et légèrement moins élevé que celui des plantes traitées aux produits chimiques.

Des études du blanc sur les roses ont été menées dans des serres au Canada et en Colombie. L'efficacité du SPORODEX WP était comparable à celle de différents fongicides chimiques et son utilisation donnait fréquemment des roses de meilleure qualité ou un plus grand rendement de roses. Le produit était moins efficace lorsque l'humidité n'était pas maintenue à un niveau élevé.

Un essai de confirmation avec la préparation liquide de SPORODEX proposée a montré que celui-ci est aussi efficace que le myclobutanil contre le blanc sur les concombres. Dans cet essai, l'application d'huile de pin (engrais) en milieu de saison a nui au SPORODEX, ce qui a mené à une diminution de son pouvoir de lutte contre la maladie sur les feuilles inférieures, et a montré que l'huile de pin n'est pas compatible avec le SPORODEX. D'autres résultats ont été obtenus de deux essais supplémentaires effectués aux Pays-Bas et en Colombie-Britannique (C.-B.). Ces résultats ont montré que la réduction du blanc et l'amélioration du rendement des roses attribuables au SPORODEX L étaient comparables aux résultats obtenus avec l'acétate de dodémorfe. Des études d'efficacité ont montré que l'humidité doit être maintenue à un niveau élevé (humidité relative (HR) >70 %) pour assurer la viabilité et l'efficacité constantes des produits SPORODEX.

Ces études démontrent que l'efficacité du SPORODEX dans la lutte contre le blanc et l'amélioration du rendement des concombres et de la qualité des roses cultivés en serre, peut être comparable aux traitements par pulvérisation de fongicides chimiques. Le SPORODEX a réduit le blanc de façon considérable en comparaison avec les témoins non traités. Bien que l'ancienne formulation n'était pas aussi efficace que les étalons chimiques, des essais limités avec des formulations plus récentes indiquent que le SPORODEX L sera aussi efficace que les étalons chimiques, pourvu que l'on maintienne l'humidité à un niveau élevé. D'ailleurs, il ne produit pas d'effets phytotoxiques, qui réduisent indirectement les rendements, comme dans le cas de certains traitements chimiques.

La dose d'application proposée du SPORODEX L était de 500 mL de produit dans 100 L d'eau, appliqué jusqu'à écoulement (1500 L/ha pour les roses coupées et les concombres et 1000 L/ha pour les plantes en pot). Cette dose d'application équivaut à une concentration de *P. flocculosa* d'approximativement 1×10^9 CFU/L, ce qui était la concentration utilisée dans la plupart des essais d'efficacité sur différentes formulations. Il se peut que le produit soit efficace à une dose inférieure à celle-ci, mais l'on ne devrait pas considérer cette possibilité jusqu'à ce qu'on ait développé des pratiques de gestion

des cultures pouvant assurer une performance plus constante de lutte contre la maladie à la dose actuelle.

7.1.5 Volume total de pulvérisation

Le SPORODEX L est destiné à être employé à une dose allant jusqu'à 1500 L d'eau par ha dans le cas des roses coupées et concombres, et jusqu'à 1000 L d'eau par ha dans le cas des plantes en pot.

7.2 Phytotoxicité pour les plantes visées (y compris différents cultivars) ou pour les produits de plantes visées (Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) 7.4)

Les formulations de SPORODEX n'ont produit aucun effet nocif chez les concombres et les roses lors des essais en serre. L'huile de paraffine (1 %) est un adjuvant utilisé avec le SPORODEX pouvant causer un léger oedème (des cloques) en dessous des feuilles de rosiers d'un cultivar, et on a cessé d'utiliser cette huile dans cet essai. On utilisait typiquement cette huile à des concentrations moins grandes dans d'autres essais et cette pratique n'est pas recommandée sur l'étiquette du SPORODEX L.

7.3 Observations d'effets secondaires indésirables ou non voulus, par exemple sur des organismes utiles et autres organismes non visés, sur des cultures successives, sur d'autres plantes ou parties traitées utilisées à des fins de propagation (par exemple, semences, coupes, stolons) (OCDE 7.5)

Le SPORODEX L a été essayé dans des serres commerciales tout au long de son développement, en employant des méthodes de production typiques, y compris la lutte intégrée (LI) et les organismes de lutte biologique. Dans ces essais d'efficacité, les observations indiquent que le produit n'a aucun effet nocif sur les plantes de culture, ni sur les insectes ou acariens, en ce qui a trait à la lutte antiparasitaire. On n'a pas cependant effectué d'analyse directe pour confirmer que le SPORODEX L n'a aucun effet nocif sur des insectes et arthropodes de lutte biologique particuliers.

7.3.1 Effets sur les cultures successives (OCDE 7.5.1)

Ne s'applique pas à l'utilisation en serre.

7.3.2 Effets sur les cultures adjacentes (OCDE 7.5.2)

Ne s'applique pas à l'utilisation en serre; les cultures adjacentes (s'il y a lieu) sont cultivées typiquement dans des compartiments distincts.

7.3.3 Effets sur la viabilité des semences (OCDE 7.5.3)

Ne s'applique pas aux cultures proposées.

7.4 Économie

Selon le demandeur, la valeur à la ferme des concombres de serre en Ontario est de 25 millions $. Il existe des régions où l'on cultive le concombre en serre en Colombie-Britannique, en Alberta et au Québec. Les cultures valent de 625 000 à 1 250 000 $ annuellement par hectare. Il existe environ 24 ha de rosiers en serre au Canada, principalement en Ontario, avec quelques opérations en C.-B., en Alberta et au Québec. Les roses de première qualité sont évaluées à 0,50 $ par tige.

Même si le blanc s'attaque rarement aux fruits, il se propage rapidement sur les feuilles et peut provoquer la perte de surface photosynthétisante et du stress hydrique, menant à une réduction de la production ou du rendement des fleurs, et jusqu'à 100 % de perte. Les moisissures peuvent aussi avoir des effets sur la qualité marchande et le prix des roses, étant donné que l'on ne tolère aucunement la présence de taches de moisissure sur les feuilles et les fleurs; et que leur qualité est diminuée. La différence de prix pour les producteurs entre les fleurs de première classe et celles de deuxième classe est de 0,15 $ par tige, et la lutte contre les moisissures peut faire augmenter les revenus de 37 000 $ par hectare. On emploie actuellement des fongicides pour contrer les moisissures, mais ils peuvent avoir des effets nocifs sur le rendement et la qualité des fruits et de la floraison.

7.5 Pérennité

7.5.1 Recensement des solutions de rechange

On emploie actuellement le contrôle de l'environnement, les cultivars tolérants, les techniques sanitaires et les fongicides chimiques pour maîtriser le blanc. On a tendance actuellement à réduire autant que possible l'utilisation de pesticides chimiques sur les cultures en serre. Il existe donc un besoin pour des solutions de rechange dans la lutte contre les maladies.

7.5.1.1 Pratiques de lutte non chimiques

Le blanc est maîtrisé en partie en contrôlant l'environnement. Il est cependant difficile d'équilibrer les différents facteurs environnementaux en raison du fait que ces facteurs influencent différemment les diverses étapes de développement des maladies. Par exemple, un taux d'humidité faible et l'eau libre sur les feuilles, suivi d'un séchage rapide de l'eau, favorisent la diminution de la maladie, malgré le fait que les fluctuations diurnes de l'humidité peuvent mener à une augmentation de la maladie. En général, les producteurs doivent éviter les conditions favorisant la croissance d'un feuillage succulent, c'est-à-dire l'ombrage, l'entassement, l'arrosage excessif et la surfertilisation. Les spores de champignons ne survivent pas longtemps à l'extérieur de la matière végétale des

plantes hôtes, donc un nettoyage approfondi et une période de pause de deux ou trois semaines entre les cultures peuvent réduire le report de l'inoculum. Les semis qui ont déjà commencé à pousser doivent être isolés des plantes plus matures productrices. Il est très laborieux de démonter et de replanter la culture de concombres en raison du volume de feuillage de vigne à manutentionner; par conséquent, les plantes sont maintenues aussi longtemps qu'il est profitable de le faire.

Les concombres et les cultivars de roses résistants à la moisissure ne sont pas disponibles en pratique pour les conditions existantes au Canada; même si certains sont résistants, ces cultivars peuvent ne pas être désirables commercialement. Par exemple, en Colombie-Britannique, on cultive les variétés de concombres les plus résistantes en automne lorsque la pression des moisissures est élevée, mais leur rendement est moins élevé et ils sont plus sensibles à la brûlure botrytique et à la pourriture noire que les variétés plus sensibles à la moisissure cultivées plus tôt dans l'année. Le choix de variétés de rose dépend de leurs chances d'écoulement sur les marchés, en raison de leur couleur et d'autres caractéristiques, plutôt que de leur tolérance au blanc.

7.5.1.2 Pratiques de lutte chimique

Il existe un nombre limité de produits de lutte contre le blanc dans les serres. Le myclobutanil et le soufre sont homologués au Canada pour les concombres, et l'acétate de dodémorfe et le cuivre sont homologués pour les roses. Les produits les plus efficaces sont systémiques, doivent être appliqués fréquemment, peuvent être toxiques aux insectes bénéfiques et sont sujets au développement de résistance chez les pathogènes responsables du blanc. On a signalé que le myclobutanil et le dodémorfe provoquent tous les deux une phytotoxicité des fleurs et des fruits dans certaines conditions, et on a signalé des cas de feuilles de superficie réduite chez le concombre et la rose. On n'a pas étudié la possibilité d'utiliser le silicium comme agent de lutte préventive contre les maladies, soit appliqué à la solution hydroponique, soit pulvérisé sur les feuilles, mais il n'a pas toujours été efficace lorsque utilisé seul. Le Milsana est un autre produit non fongicide à l'étude mais non utilisé commercialement au Canada. On a tendance actuellement à réduire autant que possible l'utilisation de pesticides chimiques sur les cultures en serre. Il existe donc un besoin pour des solutions de rechange dans la lutte contre les maladies.

Tableau 7.5-1 Produits de remplacement pour la lutte contre les maladies

Matière active	Préparation commerciale	Lieu d'action dans le [illegible]	Dose d'application (pour 1000 L)		Commentaires
			Concentré	Base	
Myclobutanil	Nova 40W	déméthylation	340 g/ha		Peut avoir des effets sur la croissance des feuilles et des fruits, sujet à la résistance
Soufre	Kumulus, MicroNiasul	emplacements multiples	1,2 à 1,5 kg		Nocif pour certains acariens bénéfiques, peut être phytotoxique
Cuivre	Phyton 27	emplacements multiples		1,25 à 2,5 L	
Acétate de dodémorfe	Meltatox 40EC	isomérase		2,5 L	Peut nuire à la qualité de la floraison

7.5.2 Compatibilité avec les pratiques de gestion courantes, y compris la LI

Le SPORODEX L peut réduire ou remplacer les pulvérisations de fongicides chimiques sur les concombres et les roses, et les essais d'efficacité ont montré que l'on peut l'alterner avec quelques-uns de ces produits. Le SPORODEX L semble également être compatible avec les méthodes de LI contre les insectes et les acariens (voir la section 7.3). Le SPORODEX L n'a cependant pas été analysé pour déterminer sa compatibilité avec tous les produits chimiques, ni avec d'autres organismes microbiens de lutte contre les maladies, et le producteur doit donc s'informer auprès du fabricant pour les derniers renseignements.

Les pratiques de LI comprennent actuellement la surveillance des cultures pour déceler les premiers signes de la maladie, et ainsi assurer que le SPORODEX L est appliqué aussitôt que possible pour augmenter au maximum son efficacité. À présent, la valeur du SPORODEX L est limitée par sa sensibilité aux changements des conditions environnementales. Les producteurs et les employés d'extension devront faire des travaux supplémentaires pour déterminer les meilleures pratiques de production locales à utiliser pour assurer la viabilité et l'efficacité du SPORODEX L dans les serres, afin d'optimiser son pouvoir de lutte contre le blanc, et ainsi réduire le besoin de produits chimiques.

7.5.3 Contribution à la réduction des risques

On prévoit que le SPORODEX L sera utilisé dans les serres pour lutter contre le blanc dans des situations de pression de maladie moins élevée et au début de la saison de croissance, afin de retarder le progrès de la maladie. De cette manière, il pourrait atténuer ou différer le besoin d'appliquer des fongicides chimiques, réduisant ainsi les risques connexes de résistance aux pesticides, et les effets sur les travailleurs et l'environnement.

7.5.4 Information sur la possibilité de développement de résistance

Les pathogènes responsables du blanc peuvent dans certains cas développer une résistance aux fongicides chimiques. La résistance au *P. flocculosa* est cependant moins probable en raison de son mode d'action élargi et son manque de persistance sur la plante de culture. Le *P. flocculosa* détruit l'intégrité des membranes des cellules, ce qui provoque des fuites dans les cellules. Les conditions optimales pour la colonisation ne sont pas présentes de façon constante dans les serres. L'organisme colonise les feuilles en l'absence du blanc mais ne se reproduit rapidement que lorsque la maladie est présente.

Le SPORODEX L joue un rôle dans la prolongation de l'efficacité des fongicides chimiques; il peut réduire la pression sur le pathogène pour développer une résistance aux fongicides dirigés en réduisant les populations de pathogènes et le nombre de pulvérisations de fongicides appliquées pour lutter contre le blanc.

7.6 Conclusions

7.6.1 Sommaire

Le SPORODEX L est une formulation liquide contenant l'organisme *Pseudozyma flocculosa* à une concentration de 3×10^{8} CFU/mL destinée à la lutte contre le blanc sur les roses et concombres cultivés en serre. La dose de SPORODEX L proposée est de 500 mL de produit dans 100 L d'eau, appliqué jusqu'à écoulement (1500 L/ha pour les roses coupées et concombres, et 1000 L/ha pour les plantes en pot). On a procédé à onze essais de *Pseudozyma flocculosa* sur les concombres aux Pays-Bas et au Canada dans des serres de recherche ou commerciales. Cinq études du blanc sur les roses ont été menées dans des serres au Canada et en Colombie. Le SPORODEX L a réduit le blanc de façon considérable en comparaison avec les témoins non traités. Bien que l'ancienne formulation n'était pas aussi efficace que les étalons chimiques, des essais limités avec des formulations plus récentes indiquent que le SPORODEX L sera aussi efficace que les étalons chimiques, pourvu que l'on maintienne l'humidité à un niveau élevé. D'ailleurs, il ne produit pas d'effets phytotoxiques, qui réduisent indirectement les rendements, comme avec certains traitements chimiques. D'autres travaux sur la gestion de l'environnement dans les serres devront être entrepris afin de bénéficier de tout le potentiel de lutte contre la maladie qu'offre le SPORODEX L.

Le SPORODEX L est un produit microbien auquel peut nuire la co-application de fongicides ou d'autres produits. La portée des précautions indiquées sur l'étiquette doit être élargie pour aviser le producteur de cette limitation et l'étiquette doit porter des directives visant à améliorer le rendement. Il n'existe aucune preuve que le SPORODEX L nuit aux autres outils comme les agents de lutte biologique, ou qu'il provoque des effets phytotoxiques sur les cultures. De plus, le SPORODEX L est généralement compatible avec les pratiques de lutte intégrée adoptées pour la production en serre.

Tableau 7.6-1 **Sommaire des propositions et recommandations figurant sur l'étiquette**

Proposition		Recommandation (basée sur l'évaluation de la valeur)
Cultures de serre	Concombre	telle que proposée
	Roses (en pot ou coupées)	telle que proposée
Dose	500 mL/100L d'eau avec 20 mL de mouillant Vaporiser jusqu'à 1500 L par ha pour les roses coupées et concombres, et jusqu'à 1000 L pour les roses en pot	telle que proposée
Méthode d'application	Vaporisation diluée appliquée au feuillage jusqu'à écoulement	telle que proposée
Calendrier d'application	Hebdomadairement à partir du premier signe de la maladie ou lorsque les conditions environnementales favorisent le progrès de la maladie	telle que proposée
Conditions	Maintenir l'HR > 70 % pendant 12 heures Ne pas appliquer en même temps que les fongicides chimiques	fournit des détails/directives supplémentaires

8.0 Politique de gestion des substances toxiques

Le *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL) dans le produit SPORODEX L ne satisfait pas les critères de la voie 1 de la PGST parce que la matière active est un organisme biologique et, par conséquent, n'est pas sujet aux critères servant à définir les propriétés de persistance, d'accumulation biologique et de toxicité des produits de lutte chimique. De plus, la préparation commerciale ne contient aucun produit de formulation, contaminant ou impureté pouvant satisfaire les critères de la voie 1 de la PGST.

9.0 Décision réglementaire

On a accordé une homologation temporaire à la matière active *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL), et le produit formulé SPORODEX L, destinés à la lutte contre le blanc sur les roses et concombres cultivés en serre en vertu de l'article 17 du *Règlement sur les produits antiparasitaires*, à condition que le demandeur d'homologation :

- dépose les certificats d'analyse pour tous les lots de production;
- signale tous les incidents d'hypersensibilité se produisant après l'homologation;
- dépose les données sur la stabilité à l'entreposage pour au moins cinq lots d'échelle pilote ou d'échelle de production;
- dépose une autre étude complète sur la toxicité/pathogénicité pulmonaire aiguë.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMLA	agent microbien de lutte antiparasitaire
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
CFU	cellule souche unipotente
CMM	cote maximale moyenne
CN	groupe de contrôle naïf
DL_{50}	dose létale à 50 %
É.-U.	États-Unis
EPA	Environmental Protection Agency (États-Unis)
EPI	équipement de protection individuelle
HR	humidité relative
IMI	indice maximum (d'irritation)
LI	lutte intégrée
LMR	limite maximale de résidus
m.c.	masse corporelle
m.s.	masse sèche
MA	gélose de Martin
MAQT	matière active de qualité technique
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PC	préparation commerciale
PCA	gélose pour dénombrement sur plaque
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PDA	gélose dextrosée à la pomme de terre
PGST	Politique de gestion des substances toxiques
RAMS	amplification aléatoire des microsatellites
SE	substance à l'essai
SME	substance morte à l'essai
US EPA	Environmental Protection Agency des États-Unis
YM	malt gélosé de levures

Annexe I Tableaux sommaires

Tableau I Sommaire des études de toxicité et de pathogénicité de *Pseudozyma flocculosa*

ÉTUDE	ESPÈCE/SOUCHE ET DOSE/SUBSTANCE À L'ESSAI	DL_{50} ou DL_{50}	ORGANE CIBLE/EFFETS IMPORTANTS/COMMENTAIRES
ÉTUDES AIGUËS			
Orale	Rat — Fisher 344, 12/sexe, ♂ $5,8 \times 10^8$ CFU[1]/animal ♀ $5,6 \times 10^8$ CFU/animal SPORODEX WP	♂ DL_{50} >$5,8 \times 10^8$ CFU/animal ♀ LD_{50} >$5,6 \times 10^8$ CFU/animal	Aucun effet sur l'augmentation de la masse corporelle ni sur la consommation alimentaire, ni aucun signe clinique de toxicité, d'infectiosité ou de pathogénicité liées au traitement. Aucune mortalité. Agent éliminé du tractus gastro-intestinal dans une période de sept jours suivant le dosage et non détecté dans l'urine, le sang ou les organes en aucun temps. Aucun résultat signifiant observé à la nécropsie. **FAIBLE TOXICITÉ ET PAS DE PATHOGÉNICITÉ.**
Pulmonaire	Rat — CD, 12/sexe, $3,2 \times 10^7$ CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	DL_{50} >$3,2 \times 10^7$ CFU/animal	Respiration laborieuse, pelage de poils rugueux, écoulement oculaire et rhinorrhée observés dans les animaux exposés à une SE[2] et à une SME[3]. Posture recourbée et léthargie observées chez une femelle exposée à une SE et un mâle exposé à une SE, respectivement. Les mortalités comprenaient 3 rats ♂ exposés à une SE, 6 rats ♂ exposés à une SME, 2 rats ♀ exposés à une SE et 4 rats ♀ exposés à une SME. Pas d'effet sur la masse corporelle, en se basant sur les rats sacrifiés le 14e jour. L'analyse de la consommation alimentaire quotidienne et les masses relatives des organes n'ont pas été identifiées ou ne tenaient pas compte des animaux qui sont morts avant leur date de sacrifice prévue. Les résultats de nécropsie comprenaient des lésions et la dilatation du poumon, des régions sombres confluentes dans les reins, des lésions et la dilatation de la rate et des lésions aux poumons des rats ♂ et ♀ exposés à une SE et une SME, et ont été attribués à la méthode de dosage et à la réaction immunologique normale du corps à une substance étrangère. L'agent a été détecté dans les poumons et dans les ganglions lymphatiques, l'estomac et l'intestin grêle. Élimination de ces organes avant le 7e jour. L'étude a été classée **INACCEPTABLE.**

Pulmonaire – pour identifier la plage	Rat — CD, 5/sexe/niveau de dosage $4,2 \times 10^7$ CFU/animal $3,4 \times 10^7$ CFU/animal $6,8 \times 10^6$ CFU/animal $3,4 \times 10^6$ CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	DL_{50} >$4,2 \times 10^7$ CFU/animal	Pas de mortalité. La masse corporelle de tous les animaux a augmenté au cours de l'étude de 14 jours. Le nombre de cas de pelage de poils rugueux survenus était proportionnel à la dose. Une rate dosée à $4,2 \times 10^7$ CFU présentait des tremblements, les yeux fermés et du pelage de poils rugueux. **LÉGÈREMENT TOXIQUE; PATHOGÉNICITÉ NON IDENTIFIÉE.** Étude classée **SUPPLÉMENTAIRE.** Les énoncés de l'étiquette doivent être améliorés.
Injection intrapéritonéale	Rat — Sprague Dawley, 12/sexe, $3,5 \times 10^7$ CFU/animal *Pseudozyma flocculosa*	DL_{50} >3.5×10^7 CFU/animal	Aucun effet sur la masse corporelle, mais l'augmentation de la masse corporelle était considérablement moindre chez les rats ♂ exposés à une SE, en dépit d'une plus grande consommation alimentaire chez les rats ♂ exposés à une SE. Pas de symptômes cliniques ni de mortalités. Nodules blancs observés sur l'estomac, le caecum, le foie ou l'intestin grêle des rats ♂ et ♀ exposés à une SE et à une SME attribués à une réaction immunologique normale à une substance étrangère. Augmentation de la masse relative de la rate chez les rats ♀ exposés à une SE et à une SME considérée aussi comme une réaction normale. Après l'injection, le microbe à l'essai a été récupéré du caecum, des reins, du foie, et des ganglions lymphatiques connexes, de la rate, de l'estomac et de l'intestin grêle des rats ♂ et ♀ exposés à une SE. L'organisme à l'essai a été éliminé dans les 7 jours suivant son administration. **LÉGÈREMENT TOXIQUE ET PAS DE PATHOGÉNICITÉ**
Toxicité et irritation cutanée	Lapin — Néo-Zélandais blanc, 5/sexe $1,2 \times 10^7$ CFU/animal *Pseudozyma flocculosa* (équivalent à approximativement 0,82 – 0,90 g/kg m.c. pour les ♂ et 0,80 – 0,91 g/kg m.c. pour les ♀)	DL_{50} >$1,2 \times 10^7$ CFU/animal (♂ DL_{50} > 0,82 – 0,90 g/kg m.c. ♀ DL_{50} >0,80 – 0,91 g/kg m.c.)	Pas de mortalités. Un lapin ♂ a perdu de la masse au cours de la première semaine mais sa masse a augmenté légèrement par la suite. La masse de tous les autres animaux a augmenté. Légère diarrhée observée dans un ♂ 7 jours après l'administration. Aucun autre symptôme clinique indésirable. Aucun signe d'irritation cutanée. **FAIBLE TOXICITÉ ET NON IRRITANT.**

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]			
Irritation oculaire	Lapin — Néo-Zélandais blanc, 6 femelles, 0,1 g (équivalent à 5,7 × 10^7 CFU/animal) SPORODEX WP	IMI[4] = 1,7/110 à l'intervalle de notation d'une heure CMM[5] = 0,22	Légère rougeur de la conjonctive observée chez 5/6 animaux à l'intervalle de notation d'une heure. À l'intervalle de notation de 24 heures, seulement 2/6 animaux continuaient à présenter une légère rougeur de la conjonctive. Il n'y avait aucun signe d'irritation oculaire à l'intervalle de notation de 48 heures. Aucun autre signe d'irritation oculaire ou de symptôme clinique indésirable. Pas de mortalités. On prévoit que la préparation SPORODEX WP sera plus irritante pour les yeux que la préparation SPORODEX L. **IRRITATION MINIMALE.**

[1] CFU = Cellules souches unipotentes
[2] SE = Substance à l'essai
[3] SME = Substance morte à l'essai
[4] IMI = Indice maximum (d'irritation)
[5] CMM = Cote maximale moyenne (basée sur les cotes des intervalles de notation de 24, de 48 et de 72 heures)

Tableau II Risque présenté aux organismes non visés par le *Pseudozyma flocculosa* (souche PF-A22 UL)

Organisme	Exposition	Justification à l'essai	Considérations
Oiseaux	Orale/ pulmonaire/ inhalation/ injection	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.
Mammifères sauvages	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.
Poissons d'eau douce	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.
Arthropodes	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.
Invertébrés non arthropodes	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.
Microorganismes	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	Même si le produit pose un certain risque pour les microorganismes, la justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison de la gamme d'hôtes limitée.
Plantes	Aiguë	Une justification d'exemption a été déposée au lieu de données.	La justification d'exemption déposée par l'entreprise a été **ACCEPTÉE** en raison du potentiel de risque limité.